
THÈSE
POUR L'OBTENTION DU
DIPLOME DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS (Pharmacie)

PAR

Jacques DETRAIT

Pharmacien de la Faculté de Montpellier

Assistant à l'Institut Pasteur

Diplômes de Bactériologie et de Sérologie de l'Institut Pasteur

Diplôme de Pharmacie industrielle de la Faculté de Montpellier

**CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DES VENINS
ÉTUDE DE LA PARASPECIFICITE
DES SÉRUMS ANTIVENIMEUX**

Présentée et soutenue le **15 DEC. 1962**

Jury { M^{lle} S. LAMBIN
M. M.M. JANOT
M. A. GERMAN

Président

Examineurs

UNIVERSITE DE PARIS

- FACULTE DE PHARMACIE

Année Scolaire 1962-63

Série U - N° 370

T H E S E

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS (Pharmacie)

par

Jacques DETRAIT

Pharmacien de la Faculté de Montpellier

Assistant à l'Institut Pasteur

Diplômes de Bactériologie et de Sérologie

de l'Institut Pasteur

Diplôme de Pharmacie industrielle

de la Faculté de Montpellier



CONTRIBUTION A L'ETUDE DES VENINS

ETUDE DE LA PARASPECIFICITE DES SERUMS ANTIVENIMEUX

Présentée et soutenue le 15 DEC. 1962

JURY : Melle S. LAMBIN
M. M.M. JANOT
M. A. GERMAN

Président
Examineurs

PERSONNEL
DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM. G. VALETTE - Doyen
M.M. JANOT - Assesseur
L. RODINEAU - Secrétaire général
L. JEANDEL - Secrétaire général adjoint
Mme S. CERTAIN - Secrétaire
Mme M.L. ESPINASSE - Secrétaire
M. G. FROISSART - Secrétaire

DOYEN HONORAIRE

M. René FABRE Membre de l'Institut

PROFESSEURS HONORAIRES

M.M. R. FABRE - Membre de l'Institut
M. DELEPINE, Membre de l'Institut
L. LAUNOY -
P. FLEURY
M. MASCRE
M. PICON
C. BEDEL

PROFESSEURS

MM.	M.M. JANOT	Pharmacie galénique (T.)
	G. VALETTE	Pharmacodynamie (T.)
	R. PARIS	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T.)
	M. GUILLOT	Physique (T.)
	J. GAUTIER	Chimie organique (T.)
Mlle	S. LAMBIN	Microbiologie (T.)
MM.	Y. RAOUL	Physiologie (T.)
	J. COURTOIS	Chimie biologique (T.)
	L. DOMANGE	Chimie minérale (T.)
	P. CRETE	Botanique (T.)
	R. TRUHAUT	Toxicologie et Hygiène industrielle (T.)
	A. MORETTE	Hydrologie (T.)
	R. CAVIER	Parasitologie (T.)
	A. QUEVAUVILLER	Hygiène et Education sanitaire (T.)
	R. MOREAU	Pharmacie chimique (T.)
	J. GUY	Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologiques (T.P.)

MM. A. GERMAN	Virologie et Sérologie (T.P.)
M. PIETTE	Biologie sanguine (T.P.)
P. MALANGEAU	Chimie analytique (T.)
M. GIRARD	Chimie appliquée à l'expertise (T.)
G. DILLEMANN	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T.)
G. DEYSSON	Cytologie végétale (T.P.)
J. FLAHAUT	Minéralogie (T.P.)
C. BOUDENE	Professeur sans chaire
A. LE HIR	Professeur sans chaire
J. RENAULT	Professeur sans chaire

MAITRES DE CONFERENCES

MM. Y. COHEN	Sciences naturelles
P. LARUELLE	Physique
G. LE MOAN	Toxicologie
P. ROSSIGNOL	Pharmacodynamie
H. RENAULT	Pharmacie chimique
C. PAOLETTI	Sciences appliquées
A. MANGEOT	Chimie analytique
P. DELAVEAU	Matière médicale
P. REYNAUD	Sciences physico-chimiques
J. POISSON	Sciences naturelles
A. DESVIGNES	Microbiologie
F. PERCHERON	Biochimie
J. SAVEL	Sciences naturelles
J. BORY	Sciences naturelles

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM. P. BINET	Parasitologie
P. GESTEAU	Physique biologique
J. GOUNELLE	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (section biologie)
J. HARIPSE	Chimie générale et pharmaceutique
J. HENRY	Chimie (4ème année)
Mme J. HUBERT	Microbiologie
MM. R. LELUC	Microbiologie
M. LEMONNIER	Chimie analytique (2è & 3è année)
Mlle S. LONGUEVALLE	Service des examens de Chimie
MM. F. PELLERIN	Chimie analytique (2è & 3è année)
R. PERLES (F.Fonc.)	Chimie biologique
J. PESTIS (F.Fonc.)	Biologie animale
R. POULLAIN	Hématologie
J. RIVET (F.Fonc.)	Physique

Mme M. ROBERT Sérologie
Mlles A. ROLLEN Biologie végétale
L. SEGUIN (F.Fonc.).. Analyse appliquée au con-
trôle des médicaments (Sec-
tion physico-chimique)
Mme M. SEILLER (F.Fonc.).. Pharmacie galénique indus-
trielle
M. J. YONGER (F.Fonc.).. Chimie analytique (1ère ann.)

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE
ET DE PHARMACODYNAMIE

M. A. CAVE Chef de travaux de pharmaco-
technie galénique
Mlle H. MORIN Chef de travaux de pharmaco-
dynamie
M. ROBBA Chef de travaux de pharmaco-
technie chimique

BIBLIOTHEQUE

Mlle Y. RUYSEN Conservateur, chargée de la
Direction
Mlle LAVAUD Conservateur
Mmes DESGRIPPES Bibliothécaire
KREHMER Bibliothécaire

.-.-.-.-.-.

A MON PERE & A MA MERE

A MA FEMME & A MES ENFANTS

A MES BEAUX-PARENTS

A MON ONCLE & A MA TANTE

ET

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A Monsieur le Professeur J. TREFOUEL

Membre de l'Institut
Membre de l'Académie des Sciences
Membre de l'Académie de Médecine
Directeur de l'Institut Pasteur
Commandeur de la Légion d'Honneur

Qui nous a fait l'honneur de
nous admettre à l'Institut
Pasteur.
En témoignage de notre très
respectueuse gratitude.

A Monsieur le Docteur N. BERNARD

Membre de l'Académie des Sciences
coloniales.
Sous-Directeur honoraire de l'Institut
Pasteur
Grand Officier de la Légion d'Honneur

Qui nous a accueilli avec tant
de bienveillance à l'Institut
Pasteur et qui n'a cessé de
nous guider de ses conseils.
En témoignage de notre très
profonde et très respectueuse
reconnaissance.

A Monsieur le Docteur vétérinaire L. NICOL

Membre de l'Académie vétérinaire
Directeur de l'Annexe de l'Institut
Pasteur de Garches
Officier de la Légion d'Honneur

En hommage de notre profond
respect et de notre gratitude
pour l'intérêt qu'il nous a
toujours manifesté.

A notre Maître

Monsieur le Docteur P. BOQUET

Chef du Service des Venins
de l'Institut Pasteur
(Annexe de Garches)

Pour l'accueil qu'il nous a fait
dans son laboratoire, et pour
les bienveillantes directives
qu'il nous a prodiguées pour
réaliser cette thèse.
En témoignage de notre profonde
reconnaissance et de notre affectueux attachement.

A Madame Y. IZARD

Assistante "Hors-Classe" au Service des
Venins de l'Institut Pasteur.

Toute notre gratitude pour l'aide
et les conseils qu'elle a eu
l'obligeance de nous donner avec
tant de gentillesse depuis notre
entrée dans le Service.

A Messieurs les membres de la Direction, A nos Maîtres,
Collègues et Amis de l'Institut Pasteur.

A Mademoiselle le Professeur S. LAMBIN

Professeur de Microbiologie
à la Faculté de Pharmacie de Paris

Qui nous a fait l'honneur de
présider le jury de cette
thèse.

En hommage de notre très respec-
tueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur M.M. JANOT

Professeur de Pharmacie galénique

Et à Monsieur le Professeur A. GERMAN

Professeur de Virologie et de Sérologie

à la Faculté de Pharmacie de Paris

Qui ont bien voulu faire partie
du jury de cette thèse.

En témoignage de notre profond
respect.

INTRODUCTION

L'ordre des Ophidiens compte quelques 2 500 espèces, dont 700 environ sont venimeuses et 200 sont vraiment dangereuses pour l'homme. Les serpents venimeux se rencontrent sur tous les continents, à l'exception cependant des régions polaires et de certaines îles comme l'Islande et la Nouvelle-Zélande ; mais leur zone de prédilection se situe dans les pays tropicaux.

Les Ophidiens venimeux sont répartis en trois groupes :

- Les Opisthoglyphes,
- Les Protéroglyphes,
- Les Solénoglyphes.

Cette répartition est basée sur un certain nombre de caractères morphologiques dont l'emplacement des crochets venimeux dans la cavité buccale et sur la forme du canal vecteur de venin. Les serpents opisthoglyphes ont leurs crochets implantés dans la partie postérieure du maxillaire supérieur ; de ce fait ils ne sont guère dangereux pour l'homme et n'entrent pas dans le cadre de notre travail. Il n'en va pas de même pour les deux autres groupes chez lesquels les crochets se trouvent placés dans la région antérieure du maxillaire supérieur, ce qui les rend particulièrement redoutables. Ces crochets sont de deux sortes, les uns sont fixes et comportent un sillon incomplètement fermé,

.../

ces particularités caractérisent le groupe des serpents protéroglyphes ; les autres possèdent un canal entièrement clos qui se termine en biseau, amenant ainsi le venin directement de la glande à la plaie causée par la morsure ; ils sont de plus doués d'une grande mobilité grâce à leur articulation spéciale sur le maxillaire qui leur permet de se détendre vers l'avant lorsque le serpent bondit sur sa proie ; ce groupe des solénoglyphes représente donc le type ophidien le plus perfectionné.

Chacun de ces groupes se divise en deux familles d'après les caractères morphologiques de la tête, des pupilles et des écailles craniennes.

<u>PROTEROGLYPHES</u>	(- <u>Elapidae</u> (Serpents terrestres en général).	Tête ovoïde Pupilles rondes Grandes plaques écailleuses recouvrant la tête.
	(- <u>Hydrophidae</u> (Serpents marins à queue plate).	
<u>SOLENOGLYPHES</u>	(- <u>Viperidae</u> (Serpents terrestres en général).	Tête triangulaire Pupilles oblongues Fines écailles craniennes.
	(- <u>Crotalidae</u>	

Les Naja, Bungarus, Sepedon, Denisonia, etc... appartiennent à la famille des Elapidae ; les Lapemis, Hydrophis, Enhydrina etc... constituent la famille des Hydrophidae ; celle des Viperidae comprend les espèces Vipera, Echis, Bitis, Cerastes etc... et celle des Crotalidae les espèces Crotalus, Bothrops

Lachesis, Trimeresurus, et Ancistrodon.

Pour situer approximativement chacune de ces familles dans leur zone d'habitat, nous indiquerons que les Elapidae abondent en Afrique, en Asie et en Australie, alors que les Hydrophiidae se cantonnent dans les eaux peu profondes des côtes vietnamiennes et malaises de l'Océan Pacifique ; les Viperidae sont dispersés à travers l'Europe, l'Afrique et l'Asie et c'est sur le continent américain et en Asie du Sud-Est que l'on trouve les Crotalidae.

Les experts de l'organisation mondiale de la santé ont établi, malgré de nombreuses difficultés de tous ordres, des rapports dans lesquels ils estiment à 40 ou 50 000 le nombre des décès, consécutifs aux morsures de serpents venimeux, chaque année. Dans cette estimation l'Asie, la Chine étant exceptée, vient nettement en tête avec 30 000 cas mortels, dont la moitié, au moins, surviennent aux Indes. L'Amérique du Sud ^{en} compte environ 3 à 4 000, l'Amérique du Nord 400, l'Europe 50 et l'Océanie 10 ; en raison de la diversité et de l'abondance des serpents venimeux qui peuplent l'Afrique, il n'a pas encore été possible de dresser un bilan sérieux. SVAROOP (195) évalue en 1954 à 500 000 le nombre des personnes victimes chaque année des serpents venimeux.

Ces chiffres sont suffisamment éloquents par eux-mêmes pour qu'il ne soit pas nécessaire de souligner l'importance des problèmes d'ordre humain et économique créés par une telle mortalité. C'est pourquoi de nombreux chercheurs, médecins et biologistes, se sont efforcés depuis une soixantaine d'années de

.../

découvrir les causes de ces hécatombes, d'étudier les symptômes cliniques provoqués par l'intoxication due aux différents venins et d'essayer de neutraliser leurs effets nocifs par quelques remèdes actifs. La recherche d'une thérapeutique efficace est menée parallèlement à l'analyse des venins eux-mêmes. Ceux-ci constituent en effet, vu leur complexité et leurs puissantes activités si diverses, un matériel de choix pour le biologiste. Peu à peu les venins livrent leurs secrets et certains de ces secrets dévoilés ont déjà été mis à profit en premier lieu pour l'amélioration des procédés de préparation des sérums antivenimeux, pour le traitement de différentes affections en second lieu.

Notre objet dans ce travail a été d'une part de rassembler les différentes méthodes employées pour le fractionnement des venins afin de faire le point sur le problème fort important de l'obtention des substances pures, susceptibles d'être étudiées "in-vivo" et "in-vitro" ; d'autre part, de rechercher les rapports qui peuvent exister entre des venins de serpents appartenant à des espèces et des familles différentes.

PREMIERE PARTIE

Données bibliographiques sur les propriétés générales
des venins, leur fractionnement et leurs principaux constituants.

PROPRIETES GENERALES DES VENINS :

A - CONSTITUTION DES VENINS :

Les venins de serpents sont des poisons complexes possédant des propriétés physiologiques et biologiques multiples. Ils constituent un véritable arsenal de substances toxiques et enzymatiques très actives. Un venin comme celui de *Naja naja* contient, par exemple, une neurotoxine, une cardiotoxine, une cholinestérase, une phosphatidase, une L-acide amino oxydase, une hyaluronidase, des proteinases, une A.T.P.ase, une ribonucléase, un inhibiteur du système cytochrome-oxydase. Soit au moins deux toxines et une dizaine de diastases.

Parmi ces substances certaines toxines et quelques enzymes ont été isolées plus ou moins à l'état pur, mais d'autres, ne l'ont pas été encore.

Cette multiplicité de constituants, tous distincts et agissant pour leur propre compte, prend naissance dans des glandes qui sont les homologues des glandes parotides chez les mammifères. Ces glandes se situent en arrière des yeux de chaque côté du maxillaire supérieur, elles ont une forme ovoïde et leurs dimensions sont variables suivant l'espèce ophidienne.

Leur structure a été étudiée et décrite avec précision par M. PHISALIX (167). Le venin sécrété est excrété par des glandes acineuses ou tubuleuses par le canal vecteur qui débouche à la base du crochet inoculateur. La compression de la glande est assurée par les fibres du muscle masséter qui l'enveloppent.

Le processus de l'élaboration du venin ressemble

.... /

à celui de la sécrétion salivaire. La glande est constituée d'un épithélium simple dont les cellules sécrétrices sont composées d'un protoplasma granuleux homogène et d'un noyau sphérique nucléolé. En cours de sécrétion le noyau est gros et le nucléole est entouré d'un halo clair. Les grains du cytoplasme très fins et réfringents, se forment aux dépens des chondriocentes. Au fur et à mesure que ces grains se rassemblent, le venin prend corps et s'écoule dans le canal excréteur où il est emmagasiné en attente de son utilisation.

L'analyse élémentaire d'un venin permet de mettre en évidence la présence de carbone, d'Hydrogène, d'Oxygène, d'Azote, de Phosphore, de Soufre, de Chlore, de Sodium, de Potassium, et de Zinc. FISCHER et NEUMANN⁽⁶⁹⁾ donnent les valeurs suivantes pour les venins secs de *Naja haje* et de *Naja nigricollis*

Venin de *Naja haje* : C= 45,77 % ; H= 6,79 % ; N= 13,01 % ;

S= 4,1 % ; P < 0,1 % ; Résidu : 1,82 %.

Venin de *Naja nigricollis* : C=43,99 % ; H=6,61 % ; N=12,93 % ;

S=4,27 % ; P < 0,1 % ; Résidu : 3,99 %

La plupart des réactions, qui caractérisent les protéines, sont positives avec les venins ophidiens : réaction xanthoprotéique (coloration jaune avec l'acide nitrique), réaction du biuret (virage au violet du sulfate de cuivre en milieu alcalin), réaction de Millon (coloration rouge avec le nitrate de mercure en présence de vapeurs nitreuses), précipitations avec l'acide picrique, l'acide tannique, les sels neutres, l'alcool, l'acétone, etc...

L'hydrolyse de certains venins a permis d'en fixer la composition en acides aminés ; c'est ainsi que dans l'hémolysine du venin de *Naja naja* DE (50) a détecté de l'Arginine, de la Cystéine, de l'Hystidine, de la Lysine, de la Tyrosine, de la Méthyonine et du Tryptophane. P. BOQUET (21) confirme la présence de tyrosine et de cystine dans le venin total mais pas de tryptophane. MERCHANTE (143) trouva dans le venin provenant d'espèces différentes de la cystine, de la tyrosine et du tryptophane. FISCHER et DORFEL (70) identifièrent dans la crotoxine de SLOTTA (190), 18 acides aminés, parmi lesquels on remarque le glycocolle, la leucine, laphénylamine, la proline, le tryptophane, la tyrosine, la sérine, la cystine, les acides aspartiques et glutamiques.

Ainsi contrairement aux assertions de certains auteurs tels que FAUST (1907 - Ref.67), les venins sont composés de substances azotées appartenant au groupe des protéides, comme PEDLER (164) dès 1878 et A.J. WALL (204) en 1883 en avaient déjà émis l'hypothèse.

B. COMPORTEMENT DES VENINS VIS-A-VIS DES AGENTS PHYSIQUES ET CHIMIQUES

Le venin frais récolté/^{soit} par massages, soit par stimulations électriques des glandes parotides, est un liquide sirupeux, limpide, en général jaune, légèrement acide ou neutre, dont la densité varie de 1030 à 1050 suivant l'espèce à laquelle appartient le serpent. Sa miscibilité à l'eau permet de le classer parmi les substances albuminoïdes.

Désséché sous vide dans de bonnes conditions et

.../

conservé au froid en flacon hermétiquement bouché, le venin garde ses propriétés pendant très longtemps. La lyophilisation semble être particulièrement efficace, ne provoquant pas de dénaturation ni même d'atténuation notable des activités enzymatiques et toxiques.

Solubilité :

Les venins secs sont assez solubles dans l'eau distillée et complètement solubles ou presque, dans l'eau rendue isotonique par l'addition de 9°/100 de chlorure de sodium.

Les venins de Viperidae sont généralement plus solubles que ceux de Colubridae.

En solution les venins s'altèrent rapidement, même lorsqu'ils sont maintenus au froid.

Action de la chaleur :

A l'état sec, les venins supportent assez bien une certaine élévation de la température ; NOGUCHI (155) soumit un venin à une température de 130°C en atmosphère sèche pendant quelques temps sans constater une atténuation sensible de la toxicité. Il n'en va plus de même quand on opère à une chaleur humide ou sur une solution. Dès 65°C, la toxicité s'abaisse. Cependant là encore on relève des variations selon qu'il s'agit de venin d'Elapidae ou de Viperidae. Ces derniers étant plus fragiles. Le venin de Cobra ne commence à s'atténuer qu'aux environs de 80°C, tandis que le venin jaune de Vipera aspis est atoxique à 70°C. La durée de l'exposition de la solution à la chaleur importe bien entendu. C'est ainsi que le venin de Mesocornis coronis, qui est un des venins les plus thermostables,

n'est pas détruit par un chauffage de cinq minutes à l'ébullition, alors que maintenu 15 minutes à 120°C, sa toxicité est fortement diminuée (H.H.SIEMENS 187). Si comme nous venons de le dire, la température, à laquelle une solution de venin est portée, a une grande importance pour son activité, le pH du milieu où se trouve dissous le venin en a une plus grande encore. C'est ainsi qu'en milieu acide, un venin supportera beaucoup mieux une température élevée alors qu'en milieu même légèrement alcalin il sera rapidement détruit.

Les constituants des venins étant plus ou moins thermolabiles, il est possible, dans une certaine mesure, de séparer diverses substances actives par la coagulation de ces substances à des températures différentes.

Action de la lumière et des Ultra -violets :

La lumière et plus particulièrement, les radiations ultra-violettes ont un pouvoir destructeur intense sur les venins en solution, d'autant plus marqué et plus rapide que la température est élevée.

Filtration :

La filtration des solutions peut entraîner des modifications importantes. Certains filtres, ceux en porcelaine notamment, retiennent la majeure partie des facteurs toxiques, d'autres suivant leur texture ou leur composition sélectionnent le passage des éléments constitutifs. On peut considérer la dialyse comme une variante de la filtration, les problèmes à résoudre étant très proches.

Adsorption :

Dans le même ordre d'idée, les venins sont facilement adsorbés par de nombreuses substances pulvérulantes, telles que le charbon animal, le kaolin, l'hydrate d'alumine, le sulfate de baryum, le phosphate de calcium, le collodion, le cholestérol, les résines synthétiques, etc... par élution, on peut dans certaines conditions, récupérer sélectivement les constituants.

Action du courant électrique :

Comme toutes les substances protéiques, les venins sont chargés électriquement, leurs divers constituants se déplaçant à des vitesses différentes dans un courant électrique. Ceux-ci peuvent être séparés par électrophorèse.

Action des acides :

Les venins sont très sensibles aux variations du pH. Les acides (ClH , SO_4H_2 , $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) dilués ne détruisent pas les propriétés toxiques du poison, mais peuvent, suivant leur concentration atténuer ou faire disparaître certaines activités enzymatiques.

Action des bases :

Il n'en va pas de même avec les bases fortes, qui diluées ou non, détruisent très rapidement toutes les propriétés toxiques et enzymatiques.

Action des Sels Neutres :

Les sels neutres tels que le sulfate et le phosphate d'ammonium, chlorure et sulfate de sodium, le sulfate de magnésium selon leur molarité précipitent sans les atténuer certaines fractions actives du venin.

.../

Action des défectuants :

Les défectuants , comme les acides trichloracétique, picrique, tannique, l'acétate de plomb, le bichlorure de mercure, les chlorures d'or et de platine précipitent également les venins. Mais certains de ces derniers sels en détruisent la toxicité.

Action des solvants organiques neutres :

Les solvants organiques neutres : alcools méthylique et éthylique, éther, acétone, chloroforme, coagulent les protéides des venins en solution entraînant dans le précipité une partie des principes actifs. L'addition de ces solvants aux solutions de venin provoque une élévation sensible de la température du milieu qui favorise une dénaturation importante, c'est pourquoi, il faut toujours effectuer de telles précipitations à basse température.

Action des oxydants :

Les oxydants tels que les composés iodés, les hypochlorites, le permanganate de potassium, l'acide chromique et l'acide nitrique altèrent irréversiblement les venins. L'oxygène, l'ozone et le peroxyde d'hydrogène atténuent lentement les propriétés du poison. Il suffit d'une trace de sels de cuivre pour que cette altération devienne très rapide.

Action des enzymes digestives :

Enfin les enzymes digestives employées couramment en chimie-biologique, comme la trypsine, la pepsine et la papaine détruisent à des degrés divers les activités venimeuses ; la trypsine agissant plus intensément que les deux autres .../

diastases.

Après ce rapide tour d'horizon, nous voyons que les venins d'une manière générale sont des substances difficiles à isoler. Toute élévation de la température au-dessus de 60 à 70°C et toute variation de pH, particulièrement dans la zone alcaline au-dessus de 10, entraîne des modifications de leurs activités toxiques et enzymatiques et même parfois leur destruction du fait d'une dénaturation partielle ou totale de leur substrat.

- ACTION PATHOGENE DES VENINS : ENVENIMATION

Selon qu'il s'agit de venins de serpents appartenant à la famille des Elapidae ou à celle des Viperidae, les symptômes cliniques et les troubles organiques observés chez les sujets, victimes d'une envenimation naturelle ou expérimentale, varient non seulement d'une famille ophidienne à l'autre, mais aussi d'une espèce à une autre espèce, classées dans la même famille.

La voie de pénétration du poison dans l'organisme de la victime et la dose inoculée interviennent sur la vitesse de diffusion du venin, les perturbations locales ou générales occasionnées et la gravité de l'intoxication.

Il est également important de noter les variations de la sensibilité à un venin donné suivant l'espèce à laquelle appartient la victime. Etant donné la diversité des manifestations toxiques d'un venin à un autre, nous décrirons les symptômes consécutifs à la morsure de Naja naja, d'Echis carinata, de Vipera xanthina palestinae et de Vipera aspis ; et nous étudie-

rons séparément l'envenimation naturelle et l'envenimation expérimentale..

1° ENVENIMATION NATURELLE

Selon Calmette (31-32) l'envenimation par le venin de Naja naja, ou par celui de Naja nigricollis qui lui est très voisin, revêt l'aspect suivant :

Aussitôt après la morsure, le blessé ressent au point d'inoculation du poison une légère brûlure peu douloureuse. Le siège de la morsure devient oedémateux. Quelques minutes après, le patient éprouve un engourdissement qui se propage à tout le corps et qui se transforme en une lassitude invincible ; ses jambes ne le portent plus et se paralysent, les bras ne sont atteints que plus tard ; sa respiration est difficile. Les muscles de la mâchoire se contractent et de la bouche s'écoule une salive mousseuse, la langue est enflée et se paralyse peu à peu. Le pouls d'abord plus rapide, se ralentit et s'affaiblit graduellement. Les paupières se ferment, mais les pupilles réagissent aux impressions lumineuses jusqu'au dernier moment. Le patient reste conscient de son état très longtemps. Les nausées et les vomissements sont fréquents, accompagnés souvent d'émissions involontaires d'urine et de matières fécales. Le blessé tombe alors dans le coma et meurt quelques instants après par asphyxie. Le coeur continue de battre pendant une ou deux heures après l'arrêt de la respiration. Ce processus dramatique se déroule en six ou sept heures rarement d'avantage.

Dans le cas d'une morsure non mortelle la convalescence est assez courte et à part l'oedème local du tissu sous-cutané autour de la plaie, on n'observe aucun trouble organique persistant. Le venin s'élimine par les urines sans provoquer de lésions rénales, la paralysie disparaît peu à peu et la sensibilité revient lentement dans la région lésée.

L'envenimation par les venins de Viperidae et plus particulièrement par les venins d'Echis carinata, de Vipera xanthina palestinae et de Vipera aspis, dont nous faisons également l'étude dans cette thèse, présente des aspects très différents de ceux que nous avons décrits pour les deux venins d'Elapidae.

En règle générale, la victime ressent immédiatement une vive douleur, au point de pénétration des crochets venimeux, qui se propage dans tout le membre correspondant. Il se crée un foyer inflammatoire autour de la plaie qui se nécrose rapidement. On observe à la surface de la peau des taches hémorragiques qui s'étendent et se rejoignent pour former de grandes plaques purpuriques. Les tissus sous-jacents s'infiltrent de sérosités sanguinolentes et se boursouflent ; l'oedème ainsi constitué, devient dur, douloureux et s'étend jusqu'à la racine du membre. Le blessé éprouve une soif intense, les muqueuses oculaires, buccales et génitales se congestionnent. Le patient tombe parfois en syncope. Si l'intoxication se généralise, on enregistre des vomissements, un affaiblissement du pouls, de l'hypothermie et enfin le coma et la mort.

Lorsque la dose de venin est insuffisante pour entraîner la mort, les lésions locales se nécrosent. Il peut se produire des infarctus pulmonaires, des hémorragies rénales avec albuminurie. La convalescence est longue, certains troubles persistent plusieurs mois ou même plusieurs années.

Le venin d'Echis carinata (42-133) fait apparaître des hémorragies autour du siège de la morsure, des hémoptysies, des gingivorragies, etc... Ultérieurement se manifestent des signes d'une anémie sévère, de la tachycardie et de la dyspnée. Ce poison qui contient, en plus d'une hémorragine et d'une coagulase, une neurotoxine, entraîne des phénomènes paralytiques.

Le venin de Vipera Xanthina palestinae (63-198) se caractérise par ses effets hémorragiques et neurotoxiques. Quelques heures après la morsure se développe rapidement un oedème extensif et douloureux qui provoque l'enflure du membre envenimé, parfois au double de ses dimensions normales. Le patient souffre de vives douleurs abdominales et de nausées suivies de vomissements et de diarrhées incessantes. Le malade est couvert de sueurs froides, sa langue est considérablement enflée. Le pouls, rapide au début, devient indécélable au cours des premières heures. A ces symptômes s'ajoutent un choc périphérique grave et des hémorragies sous-cutanées, nasales, musculaires, intestinales, rénales, etc... qui entraîne une anémie parfois mortelle.

EFRATI (63) a constaté au cours d'une autopsie, des hémorragies extensives dans les organes internes. Autour du site de la morsure, la peau et les tissus sous-jacents sont infiltrés d'un transudat sanguinolent. Les vaisseaux lymphatiques sont distendus et les poumons sont couverts de taches

hémorragiques.

Avec le venin de Vipera aspis, on observe de la prostration, de la somnolence, la respiration est de plus en plus difficile, le coma apparaît et la mort survient. Le coeur continue de battre quelques temps après l'asphyxie respiratoire.

2° - ENVENIMATION EXPERIMENTALE :

Par injection intraveineuse du venin de *Naja naja* à un lapin ou à un singe, on remarque que les symptômes sont identiques à ceux qui sont observés chez l'homme envenimé accidentellement.

Quelques minutes après l'inoculation du poison, l'animal d'expérience est pris d'une lassitude générale, il ressent rapidement une gêne respiratoire, il est anxieux, reste immobile, vomit. Les muscles de son cou ne parviennent plus à soutenir sa tête qui choit petit à petit. Il se couche sur le sol complètement paralysé. Les sphincters de la vessie et de l'anus se relâchent. Les mouvements respiratoires deviennent très difficiles, se raréfient et s'arrêtent. Le coeur continue de battre quelques temps, puis s'arrête. Si la paralysie respiratoire est compensée par une hématoxe artificielle avant la fin des pulsations cardiaques, l'animal peut être sauvé.

A l'autopsie on constate la présence d'un oedème hémorragique au point d'inoculation, des petites taches hémorragiques à la surface du foie, de la rate et des reins. Les poumons sont parsemés de petits infarctus, d'autant plus nombreux que l'intoxication a été lente. Le sang reste fluide et laqué (Calmette).

.../

L'intoxication de l'animal par le venin d'Echis carinata éprouvée par la voie veineuse est peu symptomatique, on relève cependant de la tachycardie et de la dyspnée. A la phase terminale, les membres postérieures puis antérieurs se paralysent, du sang mousseux apparaît au museau et le sujet meurt.

L'autopsie révèle des lésions hépatiques et pulmonaires, une forte congestion des reins, de la rate et du coeur. Les poumons sont en inflation et flottent à la surface de l'eau. Par injection intrapéritonéales on observe des hémorragies abdominales.

Le venin de Vipera aspis provoque de violentes convulsions, l'animal s'agite, saute, se débat, crie, tombe, inspire profondément l'air et meurt sans présenter de phénomènes paralytiques. (P. BOQUET - 20). On note à l'autopsie la présence de gros caillots de sang dans le coeur et les vaisseaux.

En résumé les venins d'Elapidae sont avant tout des poisons neurotropes qui agissent par leur toxine curarisante, alors que ceux de Viperidae sont nécrosants, hémorragipares, hémolytiques et coagulants. Cependant il est important de noter que la transition entre les deux familles n'est pas nettement tranchée ; le venin d'Echis, par exemple, ainsi que nous le démontrons ultérieurement, peut être considéré comme étant un intermédiaire, par ses propriétés neurotoxiques et hémorragipares, entre les venins de Naja naja et de Vipera aspis. Celui de Vipera palestinae, est déjà plus proche de ce dernier, comme le prouve les réactions immunologiques.

Les symptômes observés au cours de l'envenimation

.../

montrent combien l'action d'un venin est complexe ; ceci est due à la composition du venin, qui est elle-même très complexe. Bien que la connaissance de ces manifestations pathologiques, relevée au cours de l'intoxication accidentelle ou expérimentale par les venins, soit importante et même indispensable pour établir un diagnostic rapide et pour prescrire un traitement capable d'enrayer les méfaits du poison ; il est évident que l'examen clinique est bien insuffisant pour caractériser l'action d'un venin. Car cette action n'est que la résultante des effets de nombreuses substances toxiques ou enzymatiques. L'étude "in-vitro" du venin peut seule nous renseigner sur les mécanismes qui interviennent dans le processus de l'envenimation. On constate ainsi que certains composants peuvent agir en synergie avec les éléments toxiques ; par contre on observe parfois la présence dans le même venin de substances dont les effets sont antagonistes, et suivant la dose employée on enregistre, par exemple, une inhibition ou une activation de la coagulation du sang des mammifères...

Pour mener à bien l'étude des phénomènes provoqués par un venin, il faut donc séparer ses nombreux constituants, les isoler et, si possible, les obtenir à l'état pur.

D- EMPLOI DES VENINS EN THERAPEUTIQUE :

Depuis les temps immémoriaux les serpents ont inspiré à l'homme la crainte et la vénération. Du domaine religieux, ils sont très vite entrés dans celui de l'art de guérir et leur emploi sous les formes les plus variées et les plus extraordinaires se maintient au cours des siècles. La très célèbre

Thériaque dont la formule demeura insérée au Codex jusqu'en 1908 en est un bel exemple.

De nos jours encore le serpent, par les venins qu'il sécrète, conserve une place de choix dans la pharmacopée. Leur fractionnement a permis d'étudier leurs nombreuses et puissantes propriétés pharmacodynamiques et leur usage n'est pas resté ena tonné aux seules recherches théoriques.

C'est tout d'abord l'obtention de sérums antivenimeux efficaces qui retient notre attention. A. CALMETTE prépara vers la fin du siècle dernier les premiers immuns-sérums. Des sérums antivenimeux sont aujourd'hui préparés au moyen des venins prélevés sur les serpents venimeux les plus répandus. Il est parfois utile de renforcer au cours de l'hyperimmunisation des chevaux, une de leurs activités antigéniques par des injections d'un antigène purifié. C'est ainsi que S. KOCHWA, Y. IZARD, et P. BOQUET (126) en 1959 ont par ce procédé doublé le pouvoir antineurotoxique du sérum antivenin de Vipera xanthina palestinae par injection au cheval, préalablement immunisé contre le venin total, de quantités croissantes de neurotoxines extraites de ce venin par électrophorèse continue. Les venins servent également dans le traitement de diverses affections. Les venins de Vipera russellii; de Bothrops jararaca et de Bothrops atrox sont utilisés dans le traitement des hémorragies et de l'hémophilie. Les facteurs coagulants de ces venins ont d'ailleurs été isolés et conditionnés commercialement.

Le venin de *Naja naja*, par ses propriétés analgésiques a parfois apporté quelques soulagements à des malades atteints

.../

de cancer douloureux. On a signalé également un retard dans l'évolution des tumeurs. A petite dose ce venin agit comme un hypotenseur. Des rétinites hypertensives, des artérites furent ainsi soignées et des malades sujets à des crises convulsives virent leur état s'améliorer après avoir été traité par le venin de Cobra.

La pharmacopée homéopathique n'est pas en reste sur l'allopathie et fait un usage courant des venins de Naja naja, comme hypertenseur et dans certains états psychiques morbides, de Vipera aspis comme hypotenseur, et de Lachesis mutus, comme régulateur endocrinien.

Les venins offrent donc de grandes possibilités thérapeutiques, cependant leur toxicité en limite encore pour l'instant l'emploi. La détoxication et l'isolement de leurs principes actifs permettra sans doute un jour de tirer pleinement profit de leurs propriétés.

- FRACTIONNEMENT DES VENINS

L'ensemble des réactions produites sur les venins par les agents physiques et chimiques mentionnés précédemment ont orienté les recherches concernant la purification des venins vers l'emploi de méthodes de fractionnement et d'enrichissement que nous nous proposons d'exposer in-extenso dans ce travail.

A - HISTORIQUE :

Les premiers essais de fractionnement et de recherche sur la constitution chimique des venins sont dûs à Lucien BONAPARTE (18) qui, en 1843, obtint en traitant par l'alcool le venin de Vipera berus, une substance toxique qu'il nomma : " La Viperine ". Le précipité recueilli, débarrassé des matières grasses et des pigments qu'il contenait, se présentait après dessiccation, sous la forme de petites écailles. Cette substance extraite pour la première fois d'un venin se révéla par la suite comme étant un mélange.

WEIR-MITCHELL (148) en 1869, étudiant les venins de Crotale et utilisant une méthode très voisine, isola la "Crotaline" qui s'avéra, elle aussi, n'être qu'un mélange de composés azotés et toxiques.

Vingt-trois ans plus tard, WEIR-MITCHELL reprit avec REICHERT (149) ses expériences sur les venins de Crotales. Par dialyse d'une solution de venin de Crotalus adamenteus, les expérimentateurs recueillirent d'une part dans le dialysat une substance incoagulable à la chaleur, précipitable à l'alcool absolu, et non précipitable par les acides et le sulfate

.../

de cuivre qu'ils nommèrent "Pepton-Venom" et d'autre-part, dans le résidu de dialyse trois globulines dont l'une " la Globulin-venom" possédait les propriétés du venin total. Ces mêmes auteurs faisaient remarquer que les proportions de globulines et de peptones dans les venins varient suivant l'espèce ophidienne d'où ils proviennent : c'est ainsi que ^{dans} le venin d'Ancistrodon piscivorus il y a environ 24% de globulines et 75% de peptone et dans celui d'Ancistrodon contortrix 8 % de globuline pour 92 % de peptone.

En 1886, Norris WOLFENDEN (209) étudiant les venins de Naja naja et de Vipera russellii, infirma l'existence d'un acide cobroïque signalé par BLYTH/⁽¹⁴⁾ et la théorie émise par A. GAU- (81) selon laquelle les venins seraient composés de substances de même nature que les alcaloïdes. D'autre-part, le même auteur en précipitant le venin de Cobra par le sulfate de magnésie, isola une globuline, une syntonine, une sérine et une peptone. Du venin de Daboia, traité dans les mêmes conditions furent isolées des substances protéiniques identiques, mais pas de peptone.

KANTHACK (121) en 1882, reprenant l'étude du venin de Cobra en sépara une albumose toxique par des précipitations alcooliques répétées.

C.J.MARTIN et MAC GARVIE SMITH (138), la même année préparèrent une autre albumose nocive en précipitant par le sulfate de magnésie, puis par l'alcool le filtrat recueilli après chauffage d'une solution de venin de Pseudechis porphyriacus. MARTIN (139) soumit également le venin à une filtration sous pression et isola un proteide hémorragipare, coagulable à 80°C

et une albumine toxique sur les centres respiratoires et incoagulable à la chaleur.

Plus récemment, les chercheurs indous déterminèrent la composition chimique de certains venins. C'est ainsi que GANGULY et MALKANA (78-79) en 1936 traitèrent par le sulfate d'ammonium les venins de Naja naja et de Vipera russellii et qu'ils constatèrent que le premier de ceux-ci contenait 87,56 % de protéines, dont 39,7% d'albumines, 20,3% de globulines, 11,3% de protéoses primaires et 16,8 % de protéoses secondaires ; alors que le second est constitué de 96,8 % de protéines dont 22,12 % d'albumines, 23,35% de globulines, 50,52 % de protéoses et des lipoides solubles. Seuls les protéoses contiennent la toxine, une hémorragine et une hémocoagulase, les autres substances semblent être dénuées de toutes activités.

En 1938, ROY et CHOPRA (183), reprenant l'étude comparative de ces deux venins, trouvèrent, contrairement aux résultats obtenus par les auteurs précédents, plus d'albumines dans le venin de Daboia (22%) que dans celui de Cobra (18%) et moins de pseudoglobulines dans le premier (43,2 %) que dans le second (49%). De plus le venin de Daboia contient 3,6 % d'Euglobulines. De ces deux exemples, on peut retenir que les venins sont composés d'albumines, de globulines, de protéoses, de lipoides. Ce qui expliquerait que les venins d'Elapidae étant plus riches en globulines que les venins de Viperidae, soient moins solubles qu'eux dans l'eau distillée.

Ces travaux dont nous avons rapporté les résultats font usage d'une terminologie ancienne, nous les mentionnons tels que les auteurs les ont publiés, ne voulant pas en donner

une interprétation erronée.

B - TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT :

Ces techniques sont basées sur les modifications physico-chimiques que l'on peut obtenir en faisant varier un ou plusieurs paramètres, tels que le pH, la charge électrique, la diminution ou l'augmentation de la force ionique ou de la constante diélectrique sans entraîner la dénaturation des constituants du venin. Ils sont la conséquence en somme, des propriétés électriques de la molécule protéique.

Dans le cas de la séparation électrophorétique, les molécules se séparent entre elles selon leur charge électrique ; selon le pH et la force ionique de la solution tampon employée. La précipitation saline d'une protéine du venin se produit au point isoélectrique, c'est-à-dire lorsque le pH du milieu est tel que la protéine considérée ne se déplace plus lorsqu'elle est soumise à l'action d'un courant électrique. Les solvants organiques neutres modifient la constante diélectrique de la phase solvante. Les molécules s'agglutinent les unes aux autres en un coagulum qui, si l'opération est menée à basse température, se redissout en solution physiologique.

L'adsorption est la conséquence d'inter-réactions électroniques entre les molécules et l'agent adsorbant.

En privant le milieu, où se trouve dissous le venin, des ions salins nécessaires à son maintien en solution, c'est-à-dire en abaissant la force ionique, on provoque une agrégation de certaines particules protéiques, notamment les euglobulines,

.../

par l'insuffisance des groupes polaires hydrophiles. Ceci est obtenu par la dialyse à travers un sac de cellophane de porosité voulue ou encore par passage sur des résines échangeuses d'ions.

Inversement, en augmentant la force ionique, on diminue l'ionisation des groupes hydrophyles de la molécule, ce qui entraîne l'abaissement de la solubilité.

Nous étudierons donc successivement les différents procédés de fractionnement qui découlent des propriétés physico-chimiques des venins, et qui ne sont que des adaptations des méthodes de fractionnement classiques utilisées pour les substances protéiniques et les toxines bactériennes.

Nous les décrirons en adoptant l'ordre suivant :

1° Séparation par précipitation :

- a) salines - $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ SO_4Na_2 ClNa
- b) par solvants organiques neutres (alcool éthylique - alcool méthylique, acétone).

2° Séparation par électrophorèse :

- a) Electrophorèse en cellule de Tisélius
- b) Electrophorèse sur papier
- c) Electrophorèse sur gélose
- d) Electrophorèse sur amidon

3° Séparation par dialyse et Ultrafiltration

4° Séparation par les adsorbants

5° Séparation par chromatographie.

.../

PARATION PAR PRECIPITATION :

a) Par augmentation de la force ionique :

La précipitation par les sels neutres fut appliquée dès 1859 par DENIS à la séparation des protéines sanguines. Il représenta longtemps le seul moyen d'étude et d'isolement des protéines.

Les sels neutres les plus employés sont le sulfate d'ammonium, le chlorure de sodium, le sulfate de sodium à diverses concentrations et le sulfate de magnésium à saturation.

E.J. COHN (43) en 1925 établissait une formule mathématique dans laquelle il faisait dépendre la solubilité d'une protéine de la salinité du milieu en fonction du pH, de la température et de constantes caractéristiques de la protéine. A pH et température constants, le logarithme de solubilité S (en gramme par unité de volume : $\log. S = \beta' - K'_S C$ ou $\text{Log } S = \beta' - K'_S / C$, β' et K'_S étant deux constantes caractéristiques d'une protéine donnée, K'_S étant indépendant du pH et de la température, β' dépendant, lui, de ces paramètres et étant le logarithme de la solubilité extrapolée pour une concentration saline neutre.

La précipitation est ainsi fonction du pH et de la dilution initiale de la protéine à séparer. HOWE (115-114) en 1921 avait déjà montré que plus la concentration de la protéine en solution est faible, plus il faut de sels pour la précipiter.

Des abaques ont été établis pour calculer les quantités de sels à ajouter à un mélange de protéines en solution pour les séparer sélectivement les unes aux autres.

* Fractionnement par le sulfate d'ammonium :

Différentes formules permettent de calculer rapidement la quantité de sulfate d'ammonium à ajouter à une solution protéinique pour obtenir la concentration finale, en sel, désirée.

La formule proposée par WADSWORTH (203) en 1927 donne le volume X de solution saturée en sulfate d'ammonium nécessaire pour amener à la concentration saline C le volume V de solution de substance protéique :

$$X = \frac{CV}{100-C}$$

Plus récemment, en 1957, GREEN et HUGUES (102) étudièrent les lois qui régissent la précipitation par les sels neutres et publient les tables établies par DIXON (59) en 1953 qui indiquent le poids exprimé en grammes, de $SO_4(NH_4)_2$ cristallisé, nécessaire pour porter un litre de solution d'un pourcentage de saturation à un autre. Cette méthode de fractionnement a été utilisée en général, comme les autres méthodes de précipitation d'ailleurs, dans le but d'éliminer les protéines inertes contenues dans les venins, principalement les fractions globuliniques qui précipitent par le $SO_4(NH_4)_2$ au voisinage de la demi-saturation. Les principes actifs étant entraînés dans les précipités obtenus entre 60 et 100 % de saturation. C'est donc un procédé d'enrichissement particulièrement efficace.

GANGULY et MALKANA (78-79) ont ainsi doublé l'activité neurotoxique des neurotoxines des venins de Vipera russelli et de Naja naja de la façon suivante : 20 ml d'une solution de venin à 1 % sont traités par 20 ml de solution saturée de $SO_4(NH_4)_2$; le mélange obtenu est maintenu à + 4°C pendant

12 heures, après quoi le précipité formé est centrifugé puis lavé deux ou trois fois. avec une solution de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à demi-saturation. Le liquide surnageant est décanté et précipité par de nouvelles additions de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ saturant successivement à 60,70,80,90 et 100 % le milieu. Les neurotoxines des deux venins analysés sont recueillies dans ces précipités fortement souillés par des enzymes.

Les activités cholinestérasiques des venins de Naja naja et de Bungarus fasciatus furent augmentées respectivement de 20 et 11 fois par CHAUDHURY (39) en 1944 au moyen d'une méthode très voisine.

Du venin d'Ancistrodon piscivorus traité aux concentrations de 45, 52, 62 % de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, GENNARO et RAMSEY (82) isolent en 1959, 8 fractions protéiniques dont 4 d'entre elles sont toxiques et une hémolysine répartie sur trois fractions.

MAENO, MORIMURA et MITSUHASHI (136) extraient (1959) du venin de Trimeresurus flavoviridis par des précipitations successives à 25 et 43 % de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ en milieu tamponné au phosphate à pH 6, 7,2 ; et 7,5 suivie d'une adsorption sur un gel de phosphate de calcium une alpha protéinase responsable des phénomènes nécrotiques du venin. Cette enzyme était homogène à l'électrophorèse, cependant deux pics distincts étaient observés à l'ultracentrifugation.

Une protéase et une coagulase sont isolées du venin de Bothrops jararaca par HOLTZ et RAUDONAT (113) en 1956 qui utilisent des concentrations croissantes de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ allant de 31 à 95 %, le pH du milieu étant ajusté à 5. La même année HENRIQUES, LAVRAS et FICHMAN (108) détectent la présence dans ce

venin de Bothrops de 2 enzymes protéolytiques : une caséinase qui précipite entre 40 et 50 % de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et une benzoyl-L-arginine amidase entre 70 et 80 %. Cette fraction 70-80 % était ainsi purifiée 52 fois, les auteurs lui donnèrent le nom de "Bothrops protéase A". En 1959, HENRIQUEZ et ses collaborateurs (112-113-114) poursuivent leurs recherches et opèrent sur une solution de venin à 2 % tamponnée à pH 6,2 par du cacodylate de sodium 0,05 M - du $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ cristallisé lui est ajouté dans les proportions calculées d'après les tables de Green pour obtenir des concentrations salines de 40 à 80 %. Une caséinase est recueillie dans le précipité à 40-45 %, une coagulase et une ATPase à 60-65 %, une 5'nucléotidase à 65-70 % et la Bothrops protéase A à 70-80 %, quant à l'activité toxique, c'est dans les fractions obtenues entre 40 et 50 % qu'elle se trouve concentrée.

* * Fractionnement par le sulfate de sodium :

En 1936 MERCHANTE (143) utilise la méthode de HOWE (114-115) - (1921), qui consiste à séparer les albumines des globulines du sérum sanguin par le sulfate de sodium en solution à 22,2 %, pour fractionner différents venins. Cet essai fut un échec. GANGULY et MALKANA (79) n'eurent pas plus de succès avec le venin de Cobra en opérant à 37°C avec un pH de 3,8 et une concentration de 22% ; le précipité globulinique entraînant avec lui une quantité appréciable de toxine.

GHOSH, DE, KUNDU (83) en 1938 séparent la neurotoxine du venin de Naja naja en employant une concentration terminale en sel de 36 %. Le liquide surnageant le précipité est décanté et traité par l'acide phosphomolybdique qui le précipite à son

tour. Après élution 1 mg de produit desséché contenait 106 DM. Une nouvelle précipitation par l'alcool méthylique augmentait encore cet enrichissement de 106 à 124 DM.

C'est alors que GOSH et DE(1938 - Ref 84) entreprennent de déterminer les conditions optimales pour la séparation et l'activation de cette même neurotoxine cobraïque. Ils procèdent en trois étapes. La première est identique à la technique employée par GANGULY et MALKANA, c'est-à-dire que la solution de venin à 0,5 % ajustée à pH 3,8 est graduellement additionnée de SO_4Na_2 jusqu'à ce que la concentration atteigne 22 %, le mélange étant maintenu dans un thermostat à 37°C pendant une heure. Le précipité formé est centrifugé puis redissous dans l'eau et re-précipité par deux fois.

Dans la seconde étape, la solution de venin débarrassée des globulines est amenée à pH 5,8 et précipitée par deux fois avec une concentration saline de 33 %.

La troisième étape consiste en une adsorption sur acide tungstique de la fraction neurotoxique qui est ensuite éluée par une eau alcaline de pH 8, le précipité tungstique se dissolvant à ce pH. L'acide tungstique est alors éliminé sous forme de tungstate de baryum. La neurotoxine ainsi obtenue était 15 fois plus active, pour un même taux d'azote, que le venin brut, l'hémolysine en était, de plus, complètement séparée.

En 1941, GHOSH, DE et CHAUDHURY (85) reprennent cette étude en employant le même procédé. Après le premier stade; le liquide surnageant le précipité contenait 80 % de l'activité neurotoxique et après adsorption sur acide tungstique une

unité "pigeon" correspondait à 0,0095 mg de produit desséché, c'est-à-dire 30 fois moins que pour le venin brut. Ce taux de protéines par "unité pigeon" fut abaissé à 0,008 mg par précipitation à l'alcool méthylique avec un pH de 2,8 et un traitement supplémentaire au $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ l'ammenait à 0,0061 mg.

La toxine du venin de Vipera russellii fut extraite par des précipitations fractionnées par SO_4Na_2 suivies par son adsorption sur de l'hydroxyde d'aluminium. GHOSH, DE et BATTACHARYA (86) obtiennent ainsi un produit qui, pour un même taux d'azote, est 7,8 fois plus toxique que le venin brut. La neurotoxine du venin de Bungarus fasciatus recueillie dans des conditions opératoires identiques, à l'exception près que l'hydroxyde d'aluminium est remplacé par l'acide tungstique, fut enrichie 5,3 fois. L'emploi de l'hydroxyde ferrique comme adsorbant, en présence de ClNa , le pH du milieu étant ajusté à 7,2, élevait à 9 le coefficient de purification.

CHATTERJEE (38) en 1949 isola du venin de Cobra par une série de précipitations fractionnées, une enzyme inhibitrice du système cytochrome-cytochrome oxydase. Il employa pour cela une méthode mixte dans laquelle intervient le chlorure de sodium en milieu ajusté à pH 9, le sulfate de sodium à pH 3,8 et le sulfate d'ammonium à pH 4. L'activité enzymatique était 16 fois plus forte que dans le venin frais.

SARKAR (184) obtint en 1947, également par une méthode mixte, la Cardiotoxine du venin de Naja naja. Il opère en trois temps de la façon suivante ; A une solution de venin à 1 % ajustée à pH 6,5 l'auteur ajoute le sulfate de sodium dans la proportion de 22 % de solution. Cette opération est répétée

trois fois. Le précipité recueilli est remis en solution et le pH abaissé à 2,8. Cette solution est traitée 2 fois par 17 % de ClNa puis le pH étant amené à 4,2 par 12 % de ClNa le précipité obtenu est dialysé contre de l'eau distillée, remis en solution et enfin reprecipité par l'éthanol. La cardiotoxine ainsi préparée est 15 fois plus toxique que le venin brut.

* * * Fractionnement par le chlorure de sodium :

Le chlorure de sodium est beaucoup moins sélectif. Il a été cependant utilisé par les auteurs indous pour parachever certaines purifications. GANGULY et MALKANA (78) en 1936 éliminèrent les fractions globuliniques du venin de Daboia en saturant celui-ci de chlorure de sodium. Le surnageant de cette opération qui représentait 72,7 % des protéines du venin est constitué par des albumines et des protéines de faible poids moléculaires. Utilisant alors la technique d'ACTON et KNOWLESS (1) les auteurs saturent à nouveau le liquide surnageant par ClNa et chauffent le mélange à 65°C pendant 6 minutes. Les albumines sont ainsi complètement coagulées laissant en solution les protéines à très petites molécules. Celles-ci contenaient à elles seules tous les principes actifs : toxine, et coagulase, l'hémolysine étant détruite au cours du chauffage.

GHOSH et DE 1939 - REF;87) séparèrent partiellement la toxine de l'hémolysine du venin de Crotalus terrificus en saturant par ClNa une solution à 1 % de ce venin ajustée à pH 7-7,2. Le précipité formé lentement en glacière, centrifugé et lavé possédait 8 à 10 % de l'activité hémolytique et 2 à 2,5 % de la toxine du poison.

GANGULY et MALKANA (1936 - Ref. 79) puis GOHS et DE
(88)

en 1937 purifièrent l'hémolysine cobraïque en saturant le venin par ClNa . GHOSH et DE parachèvent la purification en chauffant à 86°C une solution faiblement alcaline du précipité et soumettent le surnageant recueilli à la cataphorèse. Pour le même taux de protéines, la fraction hémolytique ainsi obtenue était 4 fois plus active que le venin brut.

DE (49) reprit ultérieurement (1939) ses recherches sur l'isolement de cette hémolysine. Il précipite une solution de venin à 0,5 % par le ClNa , la concentration finale étant de 20 %. Le mélange est maintenu pendant une heure dans un thermostat à 37°C . Le précipité, centrifugé est lavé et remis en solution dans l'eau; puis reprécipité par 5 g d'acide métaphosphorique en solution. Après un repos d'une demi-heure à 37°C le précipité est séparé par centrifugation et rejeté. Afin d'éliminer l'acide phosphorique qui interfère dans le titrage de l'hémolysine, il traite le liquide surnageant par un mélange de tungstate de sodium et d'acide sulfurique. Le précipité obtenu est alors redissous dans une eau alcaline, le pH ajusté à 9,2 puis l'acide tungstique est à son tour éliminé sous forme de sel de baryum. La solution évaporée à sec contient 75 200 Unités hémolytiques pour 111,7 mg de protéines, représentant une activité 11 fois plus forte que dans le venin d'origine.

Une dernière extraction par de la pyridine refroidie à 4°C suivie d'une adsorption sur de l'hydroxyde ferrique et d'une séparation cataphorétique à pH 9,6 augmentait encore la pureté de l'enzyme.

DE(51) en 1941 modifia sa technique d'extraction de

l'hémolysine cobraïque de la façon suivante : le venin de Naja naja est soumis à trois précipitations par le ClNa, la première à pH 2,8, la deuxième à pH 4 et la troisième à pH 2,8, puis à trois précipitations au $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et à une adsorption sur de l'hydroxyde d'aluminium. L'hémolysine obtenue à l'état cristallisé par ce procédé était 17,5 fois plus active que le matériel d'origine.

1954

PIANTANIDA et MUIC (168)/fractionnèrent le venin de Vipera ammodytes de la façon suivante : une solution de venin à 5%, dialysée, est soumise à deux précipitations, l'une par 1 % et l'autre par 0,33 % de ClNa. Toutes les opérations sont faites à basse température. Trois fractions insolubles (P_1 - P_2 - P_3) et une fraction soluble (S_3) sont ainsi recueillies. Les symptômes hémorragiques sont principalement provoqués par les précipités P_1 - P_2 - P_3 , alors que les phénomènes neurotoxiques et hémolytiques sont plus intenses avec la solution surnageante S_3 .

b) fractionnement par modification de la constante diélectrique.

Les solvants organiques neutres, tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone et l'éther modifient la constante diélectrique de la phase solvante et diminuent l'ionisation des groupes polaires des protéines. Ce qui entraîne la précipitation de celles-ci. Ce mode de fractionnement est délicat à utiliser, du fait de l'échauffement notable du milieu obligeant à exécuter toutes les opérations à basse température, sous peine de provoquer une dénaturation partielle ou totale du matériel protéique.

Par ce procédé seules les fractions globuliniques sont précipitées, ce qui rend cette méthode, comme les autres méthodes de séparation basées sur la précipitation des protéines, assez peu sélective. Cinq paramètres interviennent généralement : la température, la concentration des protéines de la solution, la concentration en solvant organique, la concentration en sel et le pH.

Lucien BONAPARTE (18) précurseur dans le fractionnement des venins utilisa en 1843 l'éthanol pour extraire la "Viperine du venin de Vipera berus"; par des méthodes similaires WEIR-MITCHELL (148) en 1869 isola la "Crotaline" du venin de crotale, KANTHAK (121) une "albumose nocive" de venin de Cobra et MCGARVIE SMITH (138) une autre "Albumose toxique" du venin de Pseudechis porphyriacus.

* Fractionnement par l'éthanol :

RADOMSKI et DEICHMANN (172) en 1958 fractionnèrent un échantillon de venin de Naja flava de la manière suivante : la solution de venin est lentement additionnée de 2 volumes d'éthanol à 95 % ; le mélange se fait par agitation et la température du milieu est maintenue à -5°C. Le précipité formé est centrifugé, puis remis en solution et reprécipité par 2 volumes d'alcool comme précédemment. Les deux surnageants sont réunis et desséchés.

.../

SCHEMA DES OPERATIONS EFFECTUEES

Solution de Venin de 2 g/150 ml

+
300 ml d'Ethanol à 95 %

ipité I
issous dans 25 ml d'eau)

Surnageant I

+
ml d'Ethanol à 95 %

ipité 2

Surnageant 2

Le précipité donne une réaction de Molish positive, indiquant la présence de glycoprotéines ; la réaction est négative pour les surnageants. La neurotoxine du venin est fois plus concentrée dans ceux-ci que dans le précipité, alors que les enzymes : Lécithinase, A.T.P.ase, Ribonucléase, et Diphosphopyridine nuclé^otidase sont rassemblées dans la fraction coagulée

* * Fractionnement par le Méthanol et l'Acétone :

S.S. DE (49) en 1939 purifia l'hémolysine du venin de Naja naja en trois étapes. La solution de venin, faite en eau physiologique (la présence de sel facilitant la précipitation) est ajustée à pH 2,6-3. La première étape consiste en une précipitation à froid des protéines inertes par l'addition de 6 volumes d'alcool méthylique. Le surnageant est décanté. Dans la seconde phase, le précipité méthylique est remis en solution et le pH est relevé à 5. Une précipitation par l'acétone à froid élimine les protéines inactives et libère dans le surnageant l'hémolysine entraînée par adsorption dans le précipité alcoolique.

1.
A la troisième étape, le précipité acétonique redissous dans l'eau physiologique, est traité par de l'hydroxyde ferrique qui adsorbe ces mêmes protéines à l'exclusion de l'hémolysine qui reste en solution. Les trois liquides surnageants sont réunis et desséchés par lyophilisation. Le produit final ainsi obtenu est 11 fois plus actif que le venin de départ.

DOERY (60) en 1958 utilisa également le méthanol pour fractionner le venin de Notechis scutatus. Le venin préalablement débarassé à pH 6 du facteur coagulant par un gel de carbonate de baryum est traité par l'alcool méthylique à 30 % refroidi à -5°C. L'analyse chromatographique de la partie insoluble sur une résine IRC 50 permet de séparer une hémolysine et deux neurotoxines.

*** Fractionnement par l'Acétone :

GANGULY et MALKANA (78) en 1936 tentèrent de fractionner le venin de Vipera russellii par l'acétone. Une solution de venin à 1% était additionnée d'acétone dans la proportion de deux volumes de solvant pour un volume de solution. Toutes les fractions protéiniques étaient ainsi précipitées. Le coagulum était ensuite mis en suspension dans l'eau distillée. Les albumines et les protéines de faible poids moléculaire se redissolvaient et les globulines insolubles dans l'eau, restaient précipitées. Par cette, méthode, cependant, les auteurs purent séparer les différentes activités physiologiques du venin.

La phosphodiésterase du venin de Crotalus adamenteus a été purifiée par SINSHEIMER et KOERNER (189) 1952 - par la

méthode suivante : 100 ml d'une solution aqueuse de venin à 1 % sont traités par 67 ml d'Acétone à froid, après un repos le précipité formé est éliminé par centrifugation à 10 000/tours/mn. Au surnageant sont ajoutés 133 ml d'Acétone. Après un nouveau repos au froid, le mélange est centrifugé à 16 000 tours/mn et le surnageant est éliminé. Le précipité est remis en suspension dans 100 ml d'eau puis soumis à plusieurs précipitations à 47 et 67 % d'acétone. Le sédiment final est dissous dans l'eau puis chauffé à 65°C. Quoique ce chauffage détruit 60 % d'enzyme, la phosphodiésterase obtenue ne contient pratiquement plus de 5'Nucléotidase.

**** Fractionnement par l'éther :

Von KLOBUSITZKY (123) essaie d'obtenir en 1935 un extrait étheré, à partir du venin de Bothrops jararaca, contenant les facteurs toxiques et coagulants du venin. La séparation de ces 2 facteurs échoua.

c) Fractionnement par divers sels, solvants ou acides :

En 1886, Norris WOLFENDEN (209) traite les venins de Cobra et de Daboïa par le sulfate de magnésie et en isole différentes globulines ; MARTIN et McGARNIE SMITH (138) en 1892 sépara par le même sel une "albuminose nocive" du venin de Pscudechis porphyriacus.

FRAENKEL-CONRAT et SINGER (76) en 1956 emploient le fluorodinitrobenzène soit en solution alcoolique contenant du bicarbonate de sodium, soit en solution aqueuse bicarbonatée de pH 9,3 pour séparer le principe toxique de l'hémolysine contenu dans la Crotoxine extraite du venin de Crotalus terrificus.

Il se forme un précipité jaune surmonté d'un liquide également jaune. Ces deux fractions desséchées et hydrolysées, ont été chromatographiées. Les acides aminés qui les composent, diffèrent en quantité. D'autre part ces deux protéines sont privées d'activités physiologiques alors que la Crotoxine est nocive.

L'acide picrique fut utilisé par TETSH et WOLFF (197) en 1936 pour purifier les venins de Crotalus terrificus et d'abeilles. ROSENFELD et RUBINSTEIN (181) en 1941 sépara la toxine de la coagulase du venin de Notechis scutatus en précipitant celle-ci par addition d'acide chlorhydrique dilué.

SEPARATION PAR ELECTROPHORESE :

Les venins sont, comme nous l'avons déjà dit, des substances protéiques chargées électriquement et capables, de ce fait, de se déplacer sous les effets d'un champ électrique uniforme. Les éléments constitutifs d'un venin peuvent ainsi, sous certaines conditions, émigrer avec des vitesses différentes, ce qui permet de les mettre en évidence et parfois de les isoler.

Plusieurs procédés électrophorétiques ont été utilisés :

- 1° L'électrophorèse libre en tube en "U" de TISELIUS (199), par laquelle les constituants sont dénombrés, mais difficilement recueillis ;
- 2° Les méthodes utilisant un support solide, comme le papier, ou semi-solide, comme les gels d'agar agar ou d'amidon, qui permettent à la fois le dénombrement et l'isolement des constituants;

3° Les méthodes mixtes, où sont associés en un seul appareil l'électrophorèse et la chromatographie sur papier, qui permettent le recueil de fractions isolées.

Les venins ne supportent pas sans dommages les concentrations en ions hydrogène trop élevées, on utilise de préférence comme solvant des solutions tamponnées dont le pH est compris entre 5 et 9.

La force ionique de ces solutions est un des facteurs les plus importants à considérer ; avec la méthode de Tiselius ^{le} est plus souvent de 0,1 dans le cas de l'électrophorèse sur support (papier, gélose ou amidon) $\mu = 0,05$ et 0,1 ;

Un grand nombre de solutions tamponnées sont à notre disposition, cependant les plus couramment employées sont celles à base de véronal, de phosphate, de borate et d'acétate.

L'ampérage, le voltage et la durée de l'opération sont variables suivant la technique utilisée.

En ce qui concerne les résultats obtenus, on constate en général, que les différents constituants des venins d'Elapidés du fait des protéines fortement basiques (de point isoélectrique, à 10) qui les composent émigrent principalement vers la cathode et que ceux des venins de Vipéridae émigrent vers l'anode ; ces deux cas bien tranchés sont observés pour les venins de Naja naja et de Vipera aspis, mais ils existent bien entendu des cas intermédiaires, ceux du venin d'Echis carinata et de Vipera russellii par exemple, dont les constituants sont répartis entre les deux pôles.

a) Electrophorèse libre :

Ce mode de fractionnement est basé sur la technique

mise au point par TISELIUS (199) en 1937. Cependant dès 1938 MARX et PECK (141) ont extrait du venin de Moccassin une hémorragine et 2 hémolysines au moyen d'un appareil dit à "cataphorèse" utilisé par TODD (200) en 1927, avec un potentiel électrique de 120 V pendant 3 à 5 heures à différents pH. A pH 6 l'hémorragine et une hémolysine A émigraient vers l'anode et une hémolysine B vers la cathode, tandis qu'à pH 4 l'hémorragine se déplace vers la cathode. D'autres auteurs employèrent ce procédé un peu primitif pour parachever la purification d'une substance déjà isolée. GHOSH et DE (84) en 1938, obtiennent ainsi à pH 8 et 9 une neurotoxine cobraïque 16 et 17 fois plus pure que le venin brut en partant d'un produit déjà enrichi 15 fois par précipitation par le SO_4Na_2 et adsorption sur l'acide tungstique. POLSON (169) en 1945, fut un des premiers chercheurs à utiliser la séparation électrophorétique pour l'étude des venins. Il employa l'appareil de Tiselius, à cellule en forme d'U, auquel il apporta plusieurs modifications importantes pour rendre plus rapide les expériences et pour faciliter le prélèvement des fractions séparées dans la cellule électrophorétique en vue de procéder à des essais biologiques. POLSON (169) en 1945, puis POLSON, JOUBERT et HAIG (170) en 1946 étudièrent les venins de Naja flava, Naja naja, Naja nigricollis et de Sepedon haemachates. Ils opèrent avec une solution de venin à 1% tamponnée à pH 6,2 $\pm$ 0,1 par un mélange de phosphates monopotassique et disodique et de chlorure de sodium, la force ionique étant de 0,1. Les expériences sont faites à +2°C dans un bain-marie muni d'un thermostat. Le repérage des

fractions est effectué grâce au système d'enregistrement photographique de LAMM. En fin d'expérience, les différentes fractions sont prélevées au moyen de pipettes spéciales très fines. Des clichés photographiques sont tirés après chacun des prélèvements pour contrôler le départ d'une fraction de l'électro-diagramme d'origine.

Les auteurs obtinrent ainsi les résultats suivants :

Naja flava..... 6 fractions principales,
Naja Haje..... 7 fractions principales,
Naja naja..... 8 fractions principales,
Naja nigricollis 6 fractions principales,
Sepedon haemachates.... 4 fractions principales,

Les essais biologiques révélèrent pour chacun de ces venins provenant d'Elapidés que les activités toxiques et hémolytiques étaient associées à un composant protéique T émigrant avec des mobilités comprises entre $6,21$ et $6,6 \times 10^{45}$ V/cm²/sec. à pH 6,2. Considérant les données obtenues, en particulier la masse de ce composant T, POLSON et ses collaborateurs, estiment pouvoir expliquer l'efficacité antigénique du venin de Naja flava et l'antigénicité très inférieure des venins de Sepedon et de Naja nigricollis.

En 1947, MOURA GONCALVES et POLSON (94) utilisèrent ce procédé pour analyser les venins de Crotalus terrificus et de Pothrops jararacu. Les venins en solution préalablement dialysés sont soumis à l'électrophorèse dans un appareil de Tiselius modifié par LANGWORTH (134). Trois solutions tamponnées ont été essayées, l'une phosphatée de pH 7,7

et μ :0,1 ; la seconde composée de véronal et de citrate de pH 8,6 et μ : 0,088 et la troisième de chlorhydrate de glycine de pH 3 et μ :0,1 ; l'examen de ces diagrammes obtenus pour ces deux venins met en évidence une assymétrie totale entre les deux branches de la cellule. Cette assymétrie serait due à des réactions entre les protéines portant des charges électriques opposées qui entraîneraient la formation de complexes et seraient en relation avec la présence d'un composant X de point isoélectrique élevé. L'emploi de la glycine minimiserait sensiblement ces phénomènes. La toxine de ces venins est associée au composant T ; quant à l'activité protéolytique du ^{venin de} Crotalus, elle serait fixée sur un composant qui ne serait pas séparé des frontières salines ; tandis que pour le venin de Bothrops cette activité protéolytique émigre avec un composant légèrement plus lent que T.

Cette étude des venins de Bothrops et de Crotalus fut reprise en 1950 par MOURA et ^{Goncalves} VEIRA (95). Ces auteurs employèrent encore un tampon véronal citraté de pH 8,6 et μ :0,1 ou 0,2. Les diagrammes obtenus dans les branches ascendantes et descendantes de la cellule présentaient également une assymétrie très prononcée. Ces expériences ont cependant permis la mise en relief dans les diagrammes du venin de Crotalus terrificus des différences de composition qui existent suivant la provenance de celui-ci. C'est ainsi que le venin recueilli sur des serpents vivant dans le sud du Brésil contient de la "Crotamine", protéine basique qui n'existe pas dans les venins du nord et du centre de ce pays. Inversement, les venins provenant de ces deux régions contiennent de la "Crotoxine".

FISHER et NEUMANN (69-71) en 1954, analysèrent les venins de Naja haje, de Naja nigricollis, de Bitis arietans et d'Echis carinata au moyen d'un appareil de TISELIUS modifié²⁰⁵ par WIEDMANN/. La solution tampon était composée de véronal-acétate acide chlorhydrique à divers pH. A pH 6,2 le venin de Naja haje se sépare en 10 fractions dont trois petites émigrent lentement vers l'anode, une demeure au point de départ et 6 émigrent vers la cathode. Dans les mêmes conditions, le venin de Naja nigricollis donne 8 fractions, dont 6 se dirigent vers la cathode et une vers l'anode ; à pH 6,8 le venin de Bitis fournit 7 fractions anodiques et celui d'Echis 3 fractions anodiques et 2 fractions cathodiques.

MUIC et MENIGA (151) en 1954 tentèrent d'isoler la phosphatidase A du venin de Vipera ammodytes. Ils employèrent l'appareil de WIEDMANN avec le tampon de POLSON aux phosphates à pH 6,2. La durée de l'opération était de 2 à 4 heures. Sept composants purent être ainsi distingués. Le maximum d'activité hémolytique était associé au composant T. En 1956, GRASSET et ses collaborateurs (100) étudièrent par cette même technique, mais avec un tampon véronal de pH 8,6 et, :0,1 différents venins. Le venin de Vipera aspis donna 4 fractions, celui de Vipera ammodytes 8, les venins d'Elapidés de 5 à 7 fractions et celui de Bitis arietans 5 fractions.

De ces quelques exemples, nous pouvons conclure que l'électrophorèse "libre", malgré les nombreuses améliorations apportées, n'est pas une technique de fractionnement^à proprement parler, elle demeure une méthode d'exploration et de dénombrement des fractions protéiniques contenues dans un venin.

Les différents phénomènes qui interfèrent au cours des expériences comme la formation de complexes entre les protéines elle-mêmes ou avec la solution saline des frontières, rendent cette technique très délicate à utiliser ; d'autre part, à un pic nettement isolé relevé sur le diagramme correspond le plus souvent plusieurs activités biologiques différentes et leur prélèvement est particulièrement difficile ; enfin, les quantités de substances recueillies dans chaque fraction sont petites puisque l'on part d'un volume réduit de la solution de venin. Cette technique n'est, en somme, utilisée, que comme critère de pureté pour une ou plusieurs substances en cours de purification.

b) Electrophorèse sur papier :

La technique de séparation électrophorétique sur papier des protéines sériques, publiée simultanément par CREMER et TISELIUS (46) et par DURRUM (62) en 1950, modifiée et perfectionnée par plusieurs chercheurs, fut employée souvent avec profit pour l'étude des venins par de nombreux auteurs. Les conditions opératoires dans lesquelles les expériences furent exécutées sont très voisines. Les solutions tampon utilisées sont de compositions, de pH et de force ionique variables. Les bandes de papier filtre servant de support aux solutions de venins à analyser sont de différentes provenances : Whatman n°1 et 2, Arches n°301, Munktel n°20, Schleicher et Schull n°2043 B. A l'inverse de l'électrophorèse libre, l'électrophorèse sur papier filtre est ^{facile} / , mais les quantités de Venin analysées sont beaucoup plus petites encore, ce qui rend ce procédé peu utilisable comme méthode de préparation, et les

TABLEAU N° I

Nombre de Fractions obtenues par Electrophorèse sur papier

[illegible]

TABLEAU N°I

Nombre de Fractions obtenues par Electrophorèse sur papier
(suite)

<u>Vénins</u>	<u>Vipera xanth. palestinæ</u>	<u>Crotalus terrificus</u>	<u>Ancistrodon piscivorus</u>	<u>Crotalus atrox</u>	<u>Crotalus adamanteus</u>	<u>Crotalus horridus</u>	<u>Trimeresurus macroscopus</u>	<u>Trimeresurus gramineus</u>
<u>Mermann & Mermann</u> 4 - (104) p. Phosph. 7 - u:0,15 cm - 12h-	-	4	8	-	-	-	-	-
<u>rio 1954</u> 5) p. Véronal 8,6 - 3h V- 3,5 mA	-	3	-	-	-	-	-	-
<u>er & wa</u> -58 (90-91) p. Véronal 8,6- u:0,1 cm 16 h	6	-	-	-	-	-	-	-
<u>alves</u> - (79-80) p. Phosph. 8,7- u:0,1 cm-6h	-	3	2	3	2	3	-	-
<u>I 1949</u> 41) p. Phosph. -u:0,1 n - 16h	-	-	-	-	-	-	4-5 cat.	4
pH 7,6 p. Véronal 6							3-4 2-3	6 4-5

principes recueillis sont rarement purs. La récupération des fractions séparées est très simple, puisqu'il suffit de découper les électrogrammes en petits morceaux, perpendiculairement au sens d'émigration, en se basant sur l'emplacement des taches colorées au bleu de bromophénol obtenues sur une bande témoin, puis à éluer chaque petit morceau au moyen ^{d'une} solution chlorurée sodique isotonique.

c) Electrophorèse sur gel d'agar agar :

La technique de fractionnement des protéines plasmatiques par électrophorèse sur gélose conçue par GORDON (98) et ses collaborateurs en 1950, puis modifiée et améliorée par de nombreux auteurs tels que GRABAR (99), FRENZ (77), BÜSSARD (29) et WIEME (206) a été peu utilisée comme moyen d'enrichissement des venins, alors qu'elle est couramment employée en immunoelectrophorèse pour le dénombrement des antigènes ou pour contrôler la pureté d'un principe actif préalablement isolé. Quoique ne possédant pas un pouvoir de résolution aussi bon que l'amidon, la gélose permet d'obtenir une séparation des éléments constitutifs des venins assez satisfaisante. Contrairement au papier filtre, elle adsorbe ~~plus~~ les protéines, ce qui la rend ~~plus~~ ^{moins} sélective, les volumes de solution à analyser sont supérieurs et le flux électroosmotique est très faible. L'élution des segments découpés sur la plaque de gel est très simple également.

Par ce procédé nous avons analysé les venins de Naja naja, Naja nigricollis, Echis carinata, Vipera xanthina palestinae et Vipera aspis (56-57-58).

A l'exception des neurotoxines des venins de Naja naja et de Naja nigricollis que nous avons obtenues à l'état

pur, les activités enzymatiques étaient imbriquées les unes dans les autres. Nous résumons dans le tableau ci-dessous les résultats :

Séparation électrophorétique sur gel d'agar agar à pH 6.8

TABLEAU 2

INS	: Nbre de fractions	: ACTIVITES BIOLOGIQUES ETUDIEES
a naja	5	: Neurotoxines rendent : 60 % : Cholinestérase : Phosphatidase : Toxine choquante : L-acide amino oxydase
a nigricollis	5	: Neurotoxine : Cholinestérase : Phosphatidase : Toxine choquante : L-acide-amino oxydase
is carinata	5	: Neurotoxine : Cholinestérase : Phosphatidase : Toxine : L-acide-amino oxydase
era xanthina palestinae	4	: 2 toxines : Phosphatidase : L-acie-amino oxydase : Coagulase
era aspis	3	: Toxine : L(acide amino oxydase : Phosphatidase

Le venin de Vipera ammodytes de Bulgarie, soumis à l'électrophorèse sur gélose d'après la technique de Grabar et Williams, par NEDJALKOV et NASHKOWA (152 - 1961) se fractionne en 10 fractions protéiniques. Deux des fractions cathodiques sont composées de glyco-protéines.

d) Electrophorèse de zone sur amidon :

L'amidon, pas plus que le papier filtre et la gélose, ne constitue le milieu de support idéal en électrophorèse, cependant il a de nombreux avantages que les autres n'ont pas. Notamment il est ^{très} ~~très~~ adsorbant, ce qui facilite la séparation des substances protéiques, lui donne un pouvoir de résolution bien supérieur, et permet une récupération des principes actifs nettement meilleure ; d'autre-part, le gel qu'il fournit est plus homogène et les phénomènes d'électroosmose sont très amoindris. C'est pourquoi son emploi en électrophorèse est à présent très répandu pour le fractionnement des protéines plasmatiques et qu'il s'est étendu à l'étude des venins.

Le choix de l'amidon et le mode de préparation de son gel ont une grande importance. L'amidon utilisé est de l'amidon de pomme de terre purifié et préparé selon diverses méthodes, telles que celles de BENDER et HOBEIN ou celle de SMITHIES (1955- ref.193). Cette dernière méthode qui consiste à hydrolyser l'amidon par mélange d'acide chlorhydrique et d'acétone donne, semble-t-il de meilleurs résultats, le gel obtenu étant gorgé de solution tampon est beaucoup plus sélectif. Les solutions tamponnées aux mélanges : véronal sodique acide chlorhydrique, borax-soude, ou acide borique-soude, et ~~tris~~-citrate sont les plus couramment employés à des pH et des forces ioniques variables suivant les auteurs.

Différents types d'appareils ont été utilisés, avec les uns l'émigration électrophorétique se fait horizontalement sur plaque : (KUNKEL et SLATER (129)- FONSS-BECH et LI (75) -

NIKKILA (154), avec les autres l'émigration s'opère en colonne verticale (FLODIN et PORATH (73) - CARLSON (34) ,

* Electrophorèse sur plaque de gel d'amidon :

En 1954, MICHL (146) employa l'électrophorèse sur un gel d'amidon non hydrolysé pour l'analyse du venin de *Bothrops jararaca*, il recueillit ainsi jusqu'à 70 % des activités initiales du venin brut, alors que l'électrophorèse sur papier ne permettait la récupération que de 10 %. Le diagramme établi d'après l'extinction optique à 2 800 Å des fractions obtenues fait apparaître 4 pics principaux et l'étude de chacune de ces fractions met en évidence la présence de 10 activités biologiques différentes, séparées, mais impures.

MICHL et KISS (1959 - Ref 147) comparèrent la répartition des activités enzymatiques contenues dans les venins de *Naja nivea*, de *Bothrops atrox*, de *Crotalus adamanteus*, de *Vipera ammodytes* et de *Vipera lebetina*. Le gel d'amidon était préparé d'après les méthodes de SMITHIES et tamponnées à pH 8,4 par le mélange véronal-acide chlorhydrique. Le comportement électrophorétique de ces venins appartenant à des familles très différentes fait ressortir certaines identités de position, sinon de nature, entre plusieurs enzymes de ces venins. Le venin de *Trimeresurus flavoviridis* (Habu) soumis par OHSKA (158) à l'électrophorèse pendant 24 heures avec un courant de 225 volts et 18 milliampères sur gel tamponné à pH 9,2 - 0,1 par le borax sodé permet la séparation de 5 fractions protéolytiques actives sur la caséine qui peuvent être groupées en 3 fractions enzymatiques distinctes d'après leur action sur l'azocoll et

leur activation par les ions calcium et manganèse ou leur inhibition par l'EDTA.

De ce même venin traité dans les mêmes conditions opératoires (159) pendant 24 heures avec un courant de 310 volts et 8 milliampères, sont également isolées 2 enzymes hémorragiques (HR I et HR 2) dont l'une (HR 2) est séparable en 2 sous-fractions différentes. Là encore les principes protéolytiques et hémorragiques sont impurs, étant imbriqués les uns dans les autres.

MASTER et RAO (1961 - Ref : 142) isolèrent du venin de Naja naja 9 fractions (4 anodiques, 4 cathodiques et une stationnaire au point de départ) et du venin de Vipera russellii également 9 fractions (5 anodiques et 4 cathodiques). Le gel d'amidon hydrolysé était tamponné par le mélange tris-citrate de pH 8,6 et l'électrophorèse était faite avec un courant de 200 volts et 19 milliampères pendant 6 heures. Neuf activités enzymatiques et une neurotoxine étaient testées sur les fractions séparées du venin de Cobra et 8 dans celles de venin de Vipera russellii. Les auteurs ont remarqué deux faits intéressants :

Au cours de l'électrophorèse du venin de Naja, une ligne particulièrement nette, apparaît même sans coloration, qui se situe à proximité de la neurotoxine. La substance, qui la compose, est thermostable, mais encore non identifiée. L'autre fait notable, est relevé dans le venin de Vipera russellii dont la toxicité semble émigrer vers l'anode, alors que ces fractions sont individuellement atoxiques.

HABERMANN (105) en 1959, sépara sur plaque d'amidon tamponnée au véronal sodique - ClH à pH 9, du venin de Bothrops

jararaca 3 principes enzymatiques répartis sur 4 pics protéiniques d'émigration anodique : une thrombine (II), une estérase (I-II-III) et la substance libérant la bradykinine (III-IV)

*** * Electrophorèse sur colonne d'amidon :**

L'électrophorèse de zone en colonne d'amidon s'effectue avec un appareillage du même type que ceux qui furent conçus par FOLIN et PORATH (1954 - Ref.73) ou par CARLSON (34). Un tel appareil consiste en un tube de verre ou de matière plastique maintenu en position verticale, de longueur et de section variables suivant les auteurs. BUSSARD et COTE (1954 - Ref.28) utilisent une colonne de 40 cm de long et 40 mm de diamètre, tandis que OHSAKA (1960- Ref.158) emploie un tube en matière plastique de 120 cm de long et 36 mm de diamètre. Ce tube à électrophorèse est parfois muni d'un système de refroidissement. Des rondelles de papier filtre, ou une plaque de verre fritté, maintenues par un bouchon à la base du tube, supportent la colonne d'amidon. L'anode est connectée à la base de la colonne.

L'amidon employé est de l'amidon de pomme de terre lavé et traité par une solution tampon. Le tube est garni de cet amidon sur une hauteur variable (OHSAKA (158) 114 cm - et YANG (210) 23 cm). La solution tampon, servant au cours de l'opération, est composée de borate, de véronal ou de phosphate chez les auteurs consultés. La solution de venin est introduite dans la colonne d'amidon à une profondeur définie pour le venin à étudier. OHASAK (158) introduit une solution de venin de Trimeresurus flavoviridis à 10 % sur 6 cm à 87 cm de la hauteur de la colonne. Les conditions expérimentales

tales sont également variables suivant les auteurs : BUSSARD (29) opère avec un courant électrique de 5 V/cm pendant 13 heures YANG emploie 550 volts et 50,6 mA pendant 24 heures, et OHSAKA 20 mA et 380 volts pendant 75 heures. Lorsque l'électrophorèse est terminée; la colonne d'amidon est extraite du tube et découpée en tronçons de 1 cm qui sont élués avec le tampon employé au cours de l'expérience, ou bien l'élution à lieu à un débit moyen de 25 à 31 ml/heure directement dans le tube et les éluats sont recueillis avec un collecteur de fractions.

Cette méthode de fractionnement paraît, à la lumière des résultats obtenus, être un excellent procédé d'enrichissement des activités toxiques et enzymatiques. La récupération de celles-ci atteint des taux très élevés : 60 à 70 %. Cependant là encore, aucun des constituants n'est pur.

Voici, rassemblés, dans un tableau, quelques résultats, obtenus avec différents venins.

TABLEAU N° 3

Séparation électrophorétique sur Colonne de Gel d'Amidon

venins et auteurs	Conditions opératoires	Nombre de Fractions protéiniques	Composants étudiés	Enrichis- sements
<u>a naja</u> Bussard & (29) 1954	Tampon au borate de potassium à pH 9 - u: 0,05 5V/cm - 13 h.	4	Neurotoxine Lecithinase	3,4 fois
<u>a naja</u> <u>a</u> Yang (1959-60) 20-211-212-214)	Tamp. Vétonal-ClH pH 8,6 - u: 0,1 550V/cm - 50,6 mA 24 h.	5	Phosphomono et Diestérases Adénosine-tri- phosphatase 5-Nucléotidase) Phosphatidase A) Cholinestérase)	10 fois 26 fois

TABLEAU N°3 (suite)

Séparation électrophorétique sur Colonne de Gel d'Amidon

Enims et teurs	Conditions opératoires	Nbre de Fractions protéiniques	Composants étudiés	Enrichis- sements
<u>garus</u> <u>monotrichus</u> - g 1960) -212213)	Tamp. Véronal-ClH pH 8,6 - u: 0,1 550 V/cm - 50,6 mA 8°C. - 24 h Tamp. Phosphaté pH 7,6 - u: 0,1	3	Toxine Phosphomono et diestérases Phosphatidase Cholinestérase L-ac.Amino-Oxy- dase Hyaluronidase	5 fois A 26 f. 15 f.
<u>neresurus</u> <u>voviridis</u> saka 1960) -158)	Tamp. Borax pH 9,2 - u: 0,1 330 V/cm - 20 mA - 2°C - 75 h.	3	Toxine Protéase 2 Hémorragines	
<u>neresurus</u> <u>psquamatus</u> NG 1960) 1) EN 1949))	Tamp. Véronal-ClH pH 8,6 - u: 0,1	5 (Cathode)	L-ac.amino-oxy- dase - Phospho- mono et diest. 5-Nucléotidase ATPase - Lécithinase A Toxine	15 f.
<u>neresurus</u> <u>neus form.</u> y 1960)) 1949)	idem	3 (Cathode)	Phosphomono et diestérases 5-Nucléotidase ATPase Lécithinase A Toxine	15 f.
<u>strodon</u> <u>us</u> g 1959) -214-215)	idem	3	2 Toxines 5-Nucléotidase ATPase Phosphomono et diestérases Phosphatidase Protéinase	

3° SEPARATION PAR DIALYSE ET ULTRACENTRIFUGATION :

En 1886, W. MITCHELL et REICHERT (149), en soumettant à la dialyse le venin de Crotalus adamanteus, recueillirent une "peptone-venom" dialysable et une "globulin-venom" non dialysable qui possède les propriétés du venin total.

C.J. MARTIN (1896 - R ef.139) filtra sous une pression de 50 atmosphères une solution de venin de Pseudechis porphyriacus et en isola une protéide hémorragique et une albumine nocive pour les centres respiratoires. La neurotoxine du venin de Naja flava fut purifiée 2 à 3 fois par MICHEEL et JUNG (1936 ref. 144) par filtration sur une membrane de collodion suivie d'une dialyse contre de l'eau à travers des sacs de cellophane. La toxine était recueillie dans le dialysat, ce qui laissait supposer aux auteurs que son poids moléculaire était compris entre 2 500 et 4 000.

Enfin, BUSSARD en 1954 (Ref.30), fractionna le venin de Naja naja par ultra-filtration sur des membranes de collodion et de cellophane dont le diamètre des pores était $3 \pm 0,5$, et obtint une neurotoxine impure dont l'activité toxique est doublée par rapport à celle du venin brut.

4° SEPARATION PAR LES ADSORBANTS :

Les adsorbants demeurent encore parmi les agents les plus employés pour la purification de certaines substances de nature protéique. Depuis que WILLSTATER (208), en 1922, en a fait usage pour la séparation des enzymes. Certains chimistes ont également utilisé les adsorbants dans le but de fractionner les venins ou de les purifier.

D'après COLLOWICK (1955 - Ref.44) les problèmes d'ad-

sorption peuvent être envisagés sous deux aspects qu'il qualifie, l'un de "positif" et l'autre de "négatif". L'adsorption dite "négative" consiste à éliminer certaines protéines inactives, ou inutiles, ou même nuisibles existant dans une substance protéique complexe, qui peuvent interférer dans le cours de l'expérience. Cette adsorption ne conduit pas à une purification, mais constitue une étape de déblaiement. Alors que

l'adsorption dite "positive" s'applique aux mélanges contenant peu d'impuretés ou débarrassés de celles-ci par une adsorption "négative" ou par une précipitation fractionnée préalable.

COLLOWICK fait remarquer que l'efficacité de l'adsorption d'une protéine dépend de la nature et de l'abondance des impuretés présentes dans la solution.

Dans le cas de l'adsorption "négative", on emploie la quantité maximum d'adsorbant qui peut être tolérée par la substance à isoler sans entraîner de modification dans sa composition. Avec l'adsorption "positive", on utilise, au contraire, la quantité minimum d'adsorbant qui est nécessaire à séparer la plus grande partie de la substance désirée.

Plusieurs conditions doivent être respectées pour rendre sélective une adsorption :

- 1° La concentration en protéine de la solution,
- 2° Le rapport entre le gel adsorbant et la protéine à adsorber,
- 3° L'ancienneté du gel et son murissement.
- 4° La concentration saline de la solution,
- 5° La concentration en ions hydrogène du milieu,
- 6° La température à laquelle se fait l'opération,
- 7° Le temps de contact entre le gel et la solution.

En règle générale, la concentration en protéine des solutions utilisées ne dépasse pas 1 %, afin d'éviter certaines réactions entre les protéines. Les deuxième et troisième conditions paraissent être des facteurs particulièrement importants pour assurer la reproductibilité des expériences. La concentration saline et le pH sont également deux paramètres majeurs ; une faible salinité et un pH légèrement acide favorisent l'adsorption positive. Inversement, la concentration saline et les pH plus élevés sont parfois nécessaires à l'adsorption négative. Enfin la température à laquelle se fait l'expérience et le temps de contact entre le gel et la solution protéique sont à déterminer et à contrôler pour chaque élément à séparer. Une température trop élevée peut entraîner une dénaturation de la substance recherchée et le temps de contact doit être suffisant pour permettre à la protéine de se fixer sur le gel ; celui-ci est habituellement fixé de 15 à 30 minutes. Un grand nombre de substances de natures très variées ont été utilisées comme adsorbant avec plus ou moins de succès : le charbon animal, le kaolin, la terre de foulon, le keiselguhr, les hydroxydes d'aluminium A et C, la silice, le phosphate tricalcique, le sulfate et le carbonate de baryum, l'acide tungstique, l'hydroxyde ferrique, le collodion, le cholestérol, la lécithine, les globules rouges etc... Ces substances si diverses sont surtout employées au cours des dernières phases de la purification d'une enzyme ou d'une toxine préalablement extraite d'un venin et beaucoup plus rarement comme seul agent de fractionnement. C'est donc un rôle "négatif", c'est-à-dire fixateur d'impuretés, qu'on leur fait jouer le plus souvent. C'est ainsi que l'hydroxyde ferrique, l'acide tungstique, la terre de foulon, et le

Kieselguhr ont été principalement utilisés comme épurateurs, étant donné leur relative affinité pour les protéines inertes. Alors que les hydroxydes d'aluminium A et C et la silice, au contraire, adsorbent avec relativement plus d'avidité les neurotoxines et l'hémolysine ; quant au facteur hémocoagulant c'est le carbonate de baryum qui le fixe avec une certaine prédilection.

DE et GHOSH (51) en 1937 ont déterminé par ordre décroissant le pouvoir de ces substances vis-à-vis de la neurotoxine et de l'hémolysine du venin de Naja naja.

Silice > Kaolin > Hydroxyde d'aluminium C > Hydroxyde d'aluminium A
terre de foulon > Kieselguhr .

Le gel de silice adsorbe 85 unités neurotoxiques et 64 unités hémolytiques, tandis que le kieselguhr ne fixe que 25 unités neurotoxiques et 15 unités hémolytiques.

Divers essais ont été faits, sans beaucoup de succès, par KYES (130) en 1903 avec la lécithine, FLEXNET et NOGUCHI (72) en 1905 avec les globules rouges, et par CATAN (35-36) en 1921 avec le charbon animal pour extraire l'hémolysine cobraïque. A. BOQUET (19) en 1928 fit des essais d'hyperimmunisation contre le venin de Cobra en l'adsorbant sur du charbon Norrit.

a) L'hydroxyde ferrique : fut préparé par GHOSH (86) de la façon suivante :

1000 ml de Cl_3Fe en solution décimale sont ajoutés graduellement à 1500 ml de soude décimale en agitant fréquemment. Le précipité obtenu est lavé avec de l'eau pour

éliminer les ions chlore et mélangé de nouveau à 1000 ml de soude décinormale. Le lavage est continué jusqu'à ce que le pH soit à 7,2. La suspension est faite en eau chlorurée sodique à 0,75 % de telle façon que 10 ml contiennent 66 mg de Fe_2O_3 . Le venin en partie fractionné par SO_4Na_2 est mélangé à cette suspension, GHOSH DE, et BHATTACHARYA (86) enrichissent ainsi la neurotoxine du venin de Bungarus fasciatus environ neuf fois avec un rendement de 75 %. Il est à noter que des traces d'hémolysine poluent encore la toxine. DE, par ce même procédé, purifie onze fois l'hémolysine du venin de cobra, extrait par le ClNa .

b) Acide tungstique : GHOSH et DE (49-84-85-86) en 1938

1939, 1941, emploient cet agent adsorbant pour parfaire l'extraction des neurotoxines des venins de Naja naja et de Bungarus fasciatus. GHOSH (1938) en indique le mode de préparation :

après un fractionnement préliminaire par le SO_4Na_2 , le liquide surnageant contenant la toxine est additionné d'une solution composée de tungstate de sodium à 10 % et d'acide sulfurique 2/3 normal. Le mélange est laissé au repos pendant 10 minutes à 37 °C puis centrifugé. Le précipité est lavé avec la solution de tungstate de sodium et d'acide sulfurique. Le précipité est ensuite traité par de l'eau alcaline jusqu'à ce que le pH atteigne 8. A ce pH le précipité se dissout. L'excès d'acide tungstique est éliminé sous forme de tungstate de baryum. La neurotoxine du venin de Cobra purifiée dans ces conditions est 15 fois plus active pour un même taux d'azote que le venin brut. Cette technique permet à DE (1939) d'améliorer la purification de l'hémolysine

cobraïque et à GHOSH et ses collaborateurs (1939) d'obtenir la neurotoxine du venin de Bungarus fasciatus six fois plus active que le venin brut, mais avec un rendement assez faible.

c) Hydroxyde d'aluminium : L'hydroxyde d'aluminium C est préparé e'après la méthode de WILLSTATTER (1923 - ref 208) ou celle de FERRARESI (1961 - Ref 68). La suspension de gel contient 228 mg (DE - ref 51) ou 96 mg (GHOSH - Ref 86) de Al_2O_3 /10 ml. La solution de venin est mélangée à la suspension, le tout est agité pendant une heure puis centrifugé. Le principe actif est ensuite élué avec une solution de phosphate disodique à 1%, glycérinée à 5 % de pH7.

HANSEN (1931 - Ref. 107) séparait avec difficulté les enzymes protéolytiques de plusieurs venins de Crotalidae. DE et GHOSH (1937 - Ref/ 51) isolent ainsi du venin de Naja naja l'hémolysine et la neurotoxine et GHOSH, DE et BHATTACHARYA (1939 - ref 86) obtiennent une neurotoxine du venin de Vipera russellii 7,8 fois plus active.

d) Silice : La silice est lavée à l'acide chlorhydrique, puis à l'eau distillée, jusqu'à ce que l'eau de lavage ait un pH d'environ 6,6. Elle est ensuite mise en suspension de telle sorte que 10 ml contiennent 208 mg de SiO_2 .

Une solution à 1% de venin est ajoutée à la suspension. Le mélange est agité pendant une heure, centrifugé ensuite. Le surnageant contient les principes actifs.

DE et GHOSH (1937 - Ref; 51) emploient ensuite cette technique pour le venin de Naja naja et en séparent la neurotoxine et l'hémolysine.

D'après les résultats obtenus, on constate d'une

part que le gel de silice adsorbe fortement le neurotoxine et l'hémolysine et d'autre part que le pouvoir adsorbant augmente parallèlement à l'élévation de la valeur de pH. C'est ainsi que de pH 4,8 à pH 9,4, les unités neurotoxiques adsorbées passent de 58 à 85 ; de même pour les unités hémolytiques qui passent de 15,7 à 22,4 avec ces pH.

L'élution du gel chargé de venin avec une solution d'acide chlorhydrique N/2 pendant 30 minutes augmente de une fois et demi la purification de la neurotoxine sans améliorer celle de l'hémolysine. Une précipitation préalable par le sulfate de sodium (22%) suivie de l'adsorption à pH 3,6 - 5 sur gel de silice et élution par ClH N/2 fournit une neurotoxine 4,7 fois plus active que le venin brut pour le même taux d'azote.

Les auteurs (84) ont repris ce mode de purification en 1938 pour la neurotoxine du venin de Cobra. Ils procèdent d'abord à deux précipitations fractionnée au sulfate de sodium, l'une avec 22 % et l'autre avec 33 % de sel, puis une adsorption sur acide tungstique et terminent par une adsorption sur gel de silice à pH 9,6 suivie d'une élution avec ClH - N/2. Par ce procédé, la neurotoxine obtenue était 16p6 fois plus pure que le venin brut.

e) Carbonate de baryum :

Le gel de carbonate de baryum peut être préparé de deux façons : GANGULY et Malkana (1936 - Ref. 78) l'obtiennent par le barbotage de CO₂ dans une solution de baryte. L'élution se fait avec une solution de phosphate monopotassique glycé- rinée à 25 % de pH 6,9.

FANTL et NANCE(1947 - Ref 66) mélangent une solution

de carbonate de sodium à 10 % à une solution de chlorure de baryum en maintenant une agitation constante. Après lavage à l'eau pour éliminer les ions chlore, le précipité est prélevé et titré pour connaître sa richesse en CO_3Ba . DOERY (1958 - ref 60) utilise une telle suspension à 80-100 mg/ml. Une fois mélangée^à/la solution de venin, la concentration finale de la suspension est de 7 à 9 mg par ml. L'élution du précipité est faite par agitation avec une solution de citrate de sodium 0,2 M.

Le carbonate de baryum est un bon adsorbant du facteur coagulant et c'est dans ce but que DOERY l'a employé pour isoler du venin de Notechis scutatus scutatus.

f) Phosphate de calcium: SINGER et KEARNY (1950 - Ref 188) préparent le gel de phosphate tricalcique en précipitant une solution de chlorure de calcium 0,5 M par une solution de phosphate trisodique 0,33 M. Ce gel est abondamment lavé à l'eau distillée, centrifugé, et après remise en suspension neutralisé par le $\text{ClH } 2\text{N}$. Les ions chlore éliminés par lavage. Enfin le poids du gel en suspension est déterminé après 3 à 5 semaines de murissement en chambre froide. Il est à noter que le maximum d'adsorption d'une protéine sur ce gel est atteint au point isoélectrique de celle-ci. Un tel gel a permis aux auteurs d'isoler et de purifier la L-acide amino oxydase du venin d'Ancistrodon piscivorus en procédant de la façon suivante ; une solution aqueuse à 1 % de venin, à laquelle est ajoutée une solution de l-leucine à 0,1 M pour stabiliser l'enzyme à raison de 10 ml pour 100 ml de solution de venin, est chauffée à 73°C pendant 5 minutes. Après refroidissement dans la glace

les protéines dénaturées et précipitées sont éliminées par centrifugation. Le surnageant limpide, jaune clair, contenant l'enzyme est alors traité goutte à goutte avec agitation par 400 mg de phosphate tricalcique neutre. La suspension est centrifugée et le surnageant incolore est éliminé. Le gel sur lequel l'enzyme est adsorbée est remis en suspension homogène dans un tampon acétate 0,06-0,1 M de pH 5,6. Après centrifugation, la solution surnageante composée en majeure partie de protéines inertes, est éliminée. Le gel est remis en suspension et élué dans un tampon acétate saturé à 65 % de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ de pH 4,6. Le pH de l'éluat jaune clair, obtenu par centrifugation, est ajusté à 5,5-5,6 (point isoélectrique de l'oxydase) avec l'acide acétique et le pourcentage de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ est relevé. Le précipité jaune recueilli constitue l'enzyme, dont le taux de pureté est de 79 à 87 %. A ce stade, le rendement est de 60 à 70 %. Une purification plus poussée est obtenue par précipitation fractionnée au $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à pH 5,5. Le précipité formé est enfin remis en solution dans un tampon tris 0,05 M à pH 7,2 et dialysé contre ce même tampon. Le taux de pureté atteint 100 % avec un rendement de 50 %.



SÉPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE :

a) Chromatographie sur papier filtre :

Depuis sa conception par le botaniste TSWETT en 1903, la technique de séparation par chromatographie s'est considérablement développée après les travaux de KUHN et LEDERER (128) de MARTIN et SYNGE (140) et de CONSDEN, GORDON et MARTIN (45).

Etant donné les bons résultats obtenus en chimie biologique, en particulier dans l'étude des protéines, ce mode de fractionnement est également de plus en plus utilisé pour l'analyse des venins, soit sur papier filtre, soit sur colonne de substances adsorbantes.

La chromatographie sur papier filtre, comme l'électrophorèse sur papier, n'est pas à proprement parler, une méthode de préparation, vues les quantités minimales de produits bruts qui peuvent être analysées, cependant plusieurs auteurs l'ont employé pour l'étude de quelques venins.

Les conditions opératoires sont variables suivant les chercheurs. Plusieurs qualités de papier filtre ont été utilisées les plus courantes sont le ARCHES 301, le WHATMAN 3 MM ou le SCHLEICHER et SCHULL 2043a, parfois traitées spécialement à l'acide silicique ou à la paraffine pour augmenter leur pouvoir séparateur.

Différents solvants, mélangés ou non, ont servi au développement soit ascendant, soit circulaire des chromatogrammes. Les plus usuels sont : le phénol, les phosphates, les mélanges n-butanol-eau-acide acétique, butanol-méthyléthyl cétone-phosphate, n-propanol-eau, méthanol-chloroforme,

n-propanol-pyridine-acétate, à divers pH.

En 1955, RAUDONAT (173) soumet à la chromatographie *s ascendante* sur papier Schleicher et Schüll 2043a le dialysat obtenu à partir d'une solution de venin de Naja nivea. Le développement du chromatogramme par le mélange n-propanol-pyridine acétate de pH 4,1 met en évidence 3 zones protéiniques distinctes (1,2,3) qui représentent respectivement 19,8 % 13,9 % et 48,1% de la quantité totale de la neurotoxine du venin brut. La fraction 2 contient en plus la majeure partie de l'activité protéolytique du venin ; une "hémolysine directe" se trouve dans la fraction restée stationnaire au point de départ.

RAUDONNAT et HOLLER (174) reprirent l'étude du dialysat de ce venin en 1958, en employant la technique sur disque de papier. Ils étudièrent en particuliers la cardiotoxine déjà isolée par SARKAR (184) en 1947. Ils opèrent de la façon suivante ; le dialysat et le résidu de dialyse d'une solution de venin de Naja nivea sont respectivement déposés circulairement au centre d'un filtre rond. Le solvant, composé du mélange n-propanol-pyridine acétate arrive par capillarité grâce à une languette de papier découpée dans le filtre rond. L'expérience est faite en vase clos à + 2°C, en atmosphère n-propanol, pendant 3 à 5 heures. Quatre zones sont révélées à la coloration par l'amidoschwartz et la ninhydrine (A, B, C, D) pour le dialysat et 4 également pour le résidu de dialyse : (A', B', C',

D') seules les fractions A et A' se colorent en rouge par la dithizone, ce qui les différencie des autres et indique la présence de zinc. En A, B, et A'B' se concentre la cardiotoxine

Du venin de cobra. Ceci permet de supposer que le principe responsable de l'activité cardiotoxique du venin est une petite molécule dialysable, mais qui est partiellement liée à une protéine à grosse molécule qui n'est pas dialysable.

CIASCA RENDINA et BOVET-NITTI (1960 - Ref 178) utilisèrent la chromatographie ascendante sur papier Whatman imprégné d'acide silicique pour contrôler l'activité lécithinasique du venin de Cobra. Le solvant employé est le mélange méthanol-chloroforme (20/80). Afin de suivre la réaction enzymatique produite par le venin sur la lécithine du jauned'oeuf après incubation à pH 7,4 les auteurs prélèvent un peu de liquide et le soumettent à la chromatographie et la libération d'acide gras est mise en évidence par coloration.

Le chromatogramme du venin de *Vipera ammodytes*, obtenu par RAUDONAT (1955 - Ref 175-176) et développé par le mélange phosphate citrate de McILOAINE de pH 3,5 + n-propanol-eau pendant 8 heures à + 2°C, révèle la présence de 8 zones dont 5 sont colorables à l'amido-schwartz et 3 sont décelées par fluorescence en U.V. La fraction II contient l'activité protéolytique, et il est remarquable que cette activité protéolytique récupérée est double de celle du venin brut du fait de la présence dans le venin d'une substance inhibitrice ; l'activité lécithinasique est retrouvée dans la fractions III et une hémolysine "indirecte" est révélée dans la fraction V alors que dans le venin brut cette activité n'apparaît pas.

b) Chromatographie sur colonne de substances adsorbantes :

La chromatographie sur colonne d'adsorbant a été utilisée pour la première fois par T SWETT en 1903 pour la pré-

paration d'extraits végétaux. Depuis ces travaux, l'emploi de cette technique s'est généralisé en chimie biologique, pour le fractionnement de très nombreuses substances protéiques ou non, étant données les possibilités qu'elle offre et les bons résultats qu'elle fournit. Son usage pour l'étude et l'analyse des venins était donc indiqué. Elle permet en effet de travailler sur des quantités de substances ^{plus} importantes qu'avec les méthodes électrophorétiques et bien entendu qu'avec la chromatographie sur papier. Les adsorbants généralement employés sont l'oxyde d'aluminium, le phosphate de calcium, la cellulose, les gels de dextrane et de sephadex et surtout maintenant les nombreuses résines synthétiques échangeuses de cations comme le Dowex 50 qui est de type sulfonique et celle de type carboxylique telle l'Amberlite IRC 50 ou encore la C.M. cellulose et la Diéthylaminométhyl cellulose.

* Oxyde d'aluminium alcalin :

RAUDONAT (174) en 1958 utilise cet adsorbant pour l'étude du venin de Naja nivea dialysé. Le dialysat chromatographié et élué par une solution d'acétate d'ammonium à pH 6,8 donne 3 fractions (A, B, C). La fraction A contient la majeure partie de la toxicité, elle est six fois plus toxique que la fraction B ; elle provoque des troubles neuromusculaires et circulatoires. Les autres fractions sont moins actives.

* * Gel de phosphate tri-calcique :

La cholinestérase et la lécithinase A de ce même venin ont été purifiées et enrichies respectivement de 10 et ⁷ fois par BJORK (10), en partant des fractions riches en ces enzymes obtenues par passage du venin brut sur colonne de

DEAE-CELLULOSE. L'éluat est chromatographié sur un gel de phosphate tricalcique équilibré par un tampon phosphate de potassium 0,005 M de pH 6,7. L'élution est effectuée avec ce tampon à 0,25 M de concentration. A cette molarité seule la lécithinase est éluée, alors que la cholinestérase n'est entraînée qu'avec le tampon 0,005 M et de pH 8,5.

* * * Dowex 50 : Björk (10-11) utilise cette résine cationique comme dernière étape au cours de la purification de la phosphodiésterase et de la 5'nucléotidase du venin d'Hemachatus. Le milieu est équilibré par un tampon acétate 0,005 M de pH 5,8. Les fractions enrichies par passage sur gel de Séphadex sont chromatographiées sur DOWEX ; l'élution est faite avec le tampon acétate de pH 5,8 mais à 0,3 M de concentration. Les 2 enzymes sont ainsi séparées l'une de l'autre : la phosphodiésterase recueillie pure est 125 fois plus active que le venin brut, quant à la 5'nucléotidase son activité est multipliée par 20.

* * * * Amberlites :

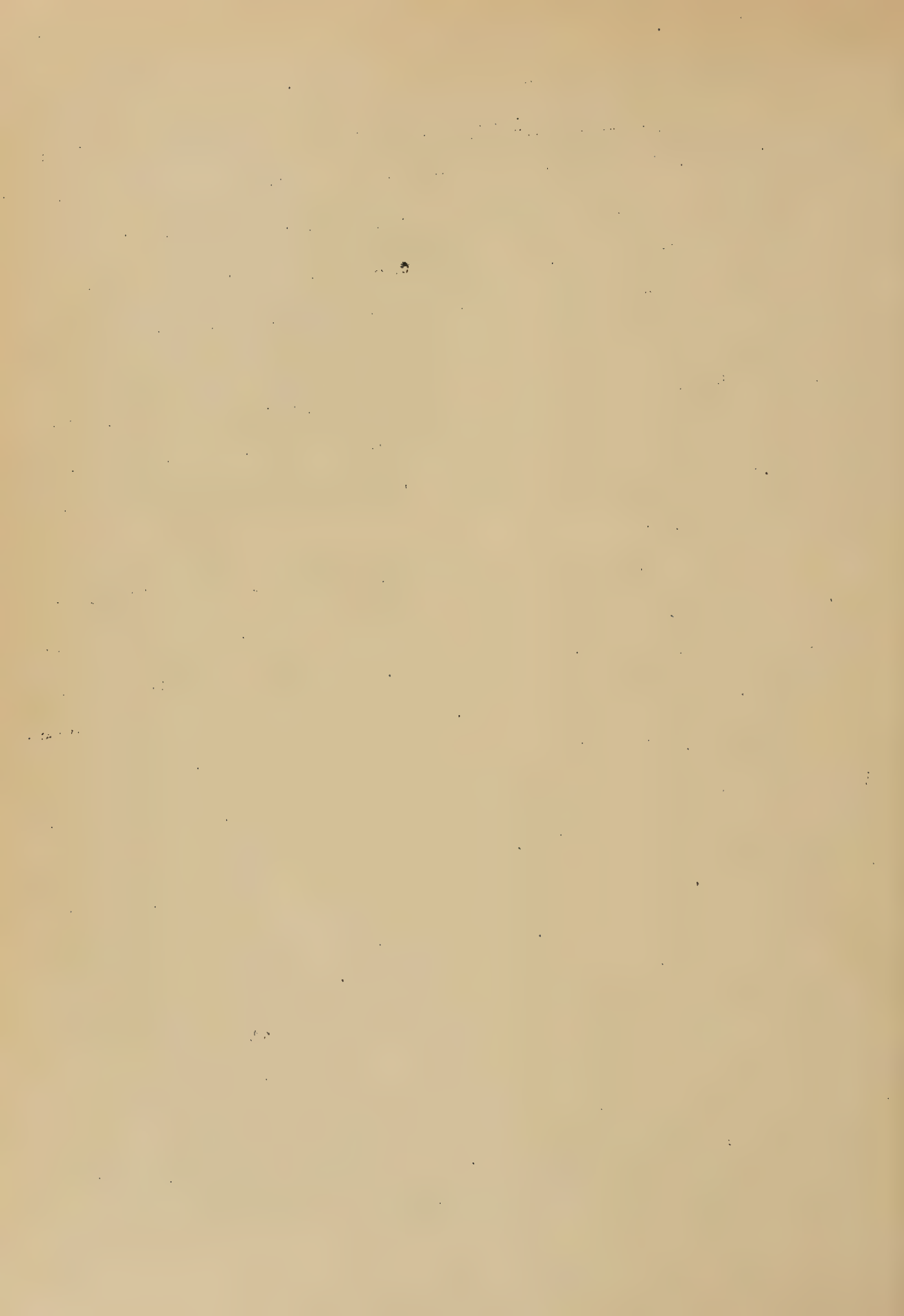
L'Amberlite IRC 50 faiblement acide a été préférée par Neumann et Habermann (153) aux Amberlites IR 120 et 400 pour l'analyse du venin de Crotalus terrificus. Le venin en solution passé sur cette résine en suspension dans un tampon acétate de pH 7 et élué avec le même tampon donne une fraction rapide qui contient à côté de la totalité de la coagulase et de la phospholipase A, 50 % de la toxicité totale, les phosphomono et di-estérases et 10 % de l'hyaluronidase du venin. La même opération faite avec un tampon phosphate 0,2 M de pH 6,8 permet de recueillir 3 fractions ; la seconde contenant 65 % de la toxicité et la totalité de la coagulase et la troisième fraction 70 % de la



phospholipase.

HABERMANN et NEUMANN (104) isolèrent la Crotactine du venin de Crotalus terrificus en procédant de la façon suivante : Tout d'abord, la coagulase du venin est éliminée en grande partie par chauffage à 70°C en milieu chlorhydrique, pendant 10 minutes. le pH étant ajusté à 4,5 avec NH_4OH -0,1N, la crotactine est précipitée en même temps que la phospholipase. Une précipitation alcoolique élimine le reste de la coagulase et un peu de la phospholipase. Le surnageant de cette précipitation est alors chromatographié sur Amberlite IRC 50 en tampon phosphate 0,2 M de pH 6,8. La toxine est éluée à l'état pure par un tampon phosphate 1 M de pH 7,4.

PRIVAT DE GARILHE et LAKOWSKI (1955 - Ref 171) purifièrent la phosphodiésthérase de ce venin de Crotalus terrificus en trois chromatographies successives. Le venin en solution dans un tampon acétate 0,2 M de pH 6,2 est déposé sur la colonne d'Amberlite IRC 50. L'élution avec ce tampon entraîne l'enzyme désaturée ; un tampon acétate de molarité 1 M de pH 6,5 élue le matériel retenu sur la résine. Cette première étape élimine la 5'nucléotidase. Le premier éluat sorti est soumis, après dialyse contre un tampon acétate 0,2 M de pH 6,2 à un deuxième passage sur Amberlite ; l'enzyme est retenu sur l'adsorbant, élué par un tampon de molarité 1 M. La fraction active est lyophilisée, redissoute dans l'eau puis dialysée sur un tampon acétate de 0,005 M et de pH 5,5 contenant du sulfate de magnésium et enfin chromatographié sur colonne de C.M. cellulose équilibrée avec un tampon acétate 0,005 M et de pH 5,5 Le développement du



chromatogramme est fait par des tampons acétate de molarités et de pH croissants. L'activité de la phosphodiésterase obtenue est de 90 % supérieure à celle du venin brut, cependant le rendement est très faible. GONCALVES (96) en 1956 purifie une neurotoxine basique, la Crotamine du venin de Crotalus terrificus collectée dans le sud du Brésil et en Argentine par passage sur Amberlite IRC 50 équilibrée avec un tampon phosphate de Na 0,2 M et de pH 6,5. L'élution par un tampon phosphate 0,2 M et de pH 7,3 fait apparaître un large pic à la lecture au spectrophotomètre sous 180° qui correspond à un volume effluent de 580 ml ; l'auteur étant parti de 250 mg de venin obtint 6,8 mg de Crotamine, soit environ 3% du venin brut. Le venin de Bothrops jararacussu, traité dans les mêmes conditions opératoires, donne plusieurs pics dont un correspondant à la Crotamine, étant élué au même volume effluent.

DOERY (60) fractionne en 1958 le venin de Notechis scutatus scutatus par une méthode très voisine des précédentes. Il élimine en premier lieu la majeure partie de la coagulase contenue dans le venin par adsorption sur carbonate de baryum, le liquide surnageant est ensuite soumis à une précipitation alcoolique de pH 5,9 - 6 à basse température avec une concentration en méthanol de 30 %. Deux fractions sont ainsi obtenues: une fraction A constituée par le précipité et le surnageant étant la fraction B. Ces deux fractions lyophilisées sont dissoutes dans un tampon phosphate 0,2 M de pH 6,6 puis chromatographiées séparément sur Amberlite IRC 50. Le développement du chromatogramme du précipité A est effectué au moyen de tampon phosphate

jusqu'à l'apparition du premier pic sur le spectrogramme établi après la lecture à 278 m μ et quand celle-ci indique que le passage des protéines est terminé, l'élution est achevée par une solution de chlorure de sodium M qui fait émerger un deuxième pic. La fraction B est éluée uniquement par le tampon phosphate 0,2 M de pH 6,6.

La fraction A contient 86 % de l'activité hémolytique et 57 % de la toxicité du venin.

* * * * * Cellulose et C-M cellulose : . . .

Le coton absorbant, des tampons de lambeaux de papier Seitz ou Whatman n°5 ont été utilisés pour la préparation de colonnes adsorbantes. HURST et BUTLER (116) en 1951, ayant constaté que le venin de Vipera russellii filtré sur papier perdait son activité phosphatidasique, soumirent ce venin à une chromatographie sur colonne de papier filtre réduit en charpie. l'enzyme est complètement retenue ; sa récupération est faite par élution au moyen d'une solution chlorurée sodique à différentes concentrations. La phosphodiésthérase est entraînée en premier, la phosphomonoésthérase ne sort qu'avec une concentration de 1 % en ClNa.

Ce procédé permet d'obtenir une phospho-diésthérase exempte de 5'nucléotidase.

La carboxy-méthyl cellulose, préparée selon la technique de Petterson et Sober (165), équilibrée par un tampon acétate de sodium 0,005 M de pH 5,8 a été utilisée par YANG (216) en 1958, pour isoler la l-acide amino oxydase, la lécithinase, la phospho-mono et di-ésthérase, la 5'nucléotidase et la protéinase du venin de Naja naja atra. L'élution est faite avec un "gradient" du tampon acétate de 0,005 M à 0,5 M et de pH 5,8 à 6,8.

Le venin de Trimeresurus flavoviridis, chromatographié par OHSAKA (1960 - Ref.161) sur la C-M cellulose équilibrée par un tampon acétate à 0,05 M de pH 6 et élué avec ce tampon auquel sont ajoutées des quantités croissantes de ClNa de 0,05 M à 0,45 M est fractionné en 9 zones distinctes. Le spectre en U.V. fait apparaître 6 pics principaux. Dans la fraction I, se concentre la majeure partie des activités toxiques et hémorragiques. D'après les résultats obtenus, OHSAKA conclut d'une part que l'activité protéolytique de ce venin est indépendante de la toxicité et de l'hémorragine et d'autre part qu'il existe 2 toxines (I et VII) et 2 hémorragines (I et VI-VII) différentes.

MAENO et MITSUHASHI (1961 - Ref. 137) reprennent l'étude de ce venin de Habu et, employant la même technique que OHSAKA, en séparant 5 diestérases qui sont distribuées respectivement dans les effluents 0,05 M ; 0,1 M ; 0,2 M ; et 0,3 M de ClNa. Les diestérases entraînées avec les effluents 0,2 M et 0,3 M étant inactifs sur l'acide déoxyribonucléique et sur le bis phosphate (p-nitrophényl) sont des ribonucléases. Une seule protéase est recueillie par l'effluent 0,2 M de ClNa, contrairement aux premières expériences de 1959-1960 dans lesquelles les auteurs obtenaient 3 enzymes protéolytiques. La toxine létale est répartie sur 3 fractions et par de nouvelles chromatographies elle est nettement distincte des activités enzymatiques. La présence d'autres enzymes, telles que la 5'nucléotidase, la l-acide amino oxydase et la phosphomonoestérase a été également observée.

CAREY et WRIGHT (1960 -REF 33) isolèrent du venin

d'Enhydrina schistosa une neurotoxine pure par passage sur C-M cellulose tamponnée à pH 6,6 et éluée par différents tampons de molarités 0,06 et 0,08 M.

* * * * * Diéthyl-aminoéthyl-cellulose :

BOMAN et KALETTA (1956-1957 - Ref 15-16) ont étudié le comportement enzymatique du venin de *Crotalus adamanteus*. Ils ont pour cela employé la DEAE cellulose, préparée selon la méthode de PETERSON et SOBER, tamponnée avec une solution de Tris-hydroxyméthyl-amino-méthane-acide chlorhydrique (THAM-ClH) 0,02 M à différents pH ; Les chromatogrammes étant développés à ces pH avec des molarités de 0,25 à 0,40 M. Il est à noter que les courbes représentatives des diverses activités enzymatiques tracées avec une densité optique en UV. de 280 m μ , s'élargissent progressivement avec l'élévation du pH de 7,3 à 8,2 et l'augmentation de la molarité. Trois diestérases, une déoxyribonucléase, une lécithinase et une L-acide-amino oxydase sont ainsi répertoriées, mais non isolées ; d'autre part les activités phosphodiésterasique et déoxyribonucléique, étant donné leur parallélisme étroit, sembleraient dûes à une seule enzyme.

Le venin de Crotalus atrox a été chromatographié par Pfeiderer et SUMYK (1961 - Ref.166) par passage sur DEAE-Cellulose équilibrée par le tampon phosphaté de SOERENSEN de pH 7,2. L'élu-tion était effectuée au moyen d'un gradient de ce tampon de 0,01 M à 0,20 M. Trois zones protéolytiques sont ainsi obtenues () ; le maximum de cette activité étant concentré dans la fraction (70-80%). D'autres facteurs sont également entraînés en même temps que les protéases : la toxine, la phosphodiésterase, la 5'nucléotidase, l'ATP-pyrophosphatase et une substance coagulant

le fibrinogène étaient déterminée dans la première zone (A.). Un second facteur coagulant le fibrinogène et la l-acide amino oxydase étaient éluées en même temps que la protéase ; l'activité lécithinasique était retrouvée dans l'effluent contenant la protéase .

BJORK, BONAM et PORATH (1959-1960-1961 -refs:10-11-12-17) entreprirent de fractionner et de dénombrer les principales enzymes contenues dans le venin d'Hemachatus hemachates d'Afrique du sud . Son analyse chromatographique sur DEAE-cellulose équilibrée par le "tampon" "THAM-ClH" de pH 8,9 0,005 M et son développement par ce tampon de molarité 0,33, ont révélé l'hétérogénéité de la composition du venin suivant les conditions de récolte et de séchage. Ces auteurs ont étudié notamment les anomalies que présente la phosphodiésterase, qui, selon les échantillons de venin, se comporte comme une seule enzyme et parfois comme trois. Il s'agirait d'une auto-digestion que le venin subirait spontanément au cours de son prélèvement.

KOCHWA, GITTER (92-125) et collaborateurs ont fractionné le venin de Vipera palestinae en 5 fractions principales par chromatographie sur cet échangeur d'ions, le milieu est équilibré par un tampon phosphate 0,005 M de pH 8,1 et l'élution est assurée par ce tampon à 0,005M suivi du passage d'un gradient de pH 6,8 à 0,2M et achevée par une solution de ClNa à 1 M. Deux neurotoxines distinctes sont ainsi mises en évidence : l'une dans la fraction I et l'autre dans la fraction V. De même 3 facteurs hémorragiques, dont les propriétés biologiques semblent différentes, sont séparées et réparties dans les 2ème, 3ème et 4ème fractions. L'immunoélectrophorèse de ces fractions

révèle la présence de 10 lignes de précipitation pour la fraction I, 7 pour la fraction II, 3 pour la fraction III, 2 pour la fraction IV, et 4 pour la cinquième fraction. L'activité protéasique est retrouvée dans les fractions I, II, III et V ; la l-acide amino oxydase dans la 2^e et 3^e fractions en même temps qu'un pigment jaune ; la lécithinase dans les 3^e et 4^e fractions.

La même technique a été utilisée par ces auteurs pour l'étude du venin d' Echis colorata. Deux fractions principales sont ainsi recueillies : dans la première se trouvent rassemblées la neurotoxine, l'hémorragine, une anticoagulase, une protéase, la l-acide amino oxydase, une fibrinolysine, un pigment jaune et un pigment violet ; dans la seconde fraction : la majeure partie de la toxine, de l'hémorragine et de la protéase, la l-acide amino oxydase et un pigment jaune.

De ces essais on peut constater qu'aucune substance n'est obtenue à l'état pur, une même activité enzymatique se trouvant répartie sur plusieurs fractions. C'est pourquoi, KOCHWA (125) procéda pour la première fraction obtenue du venin de Vipera palestinae à une seconde chromatographie sur ~~Cl~~-cellulose tamponnée au tampon phosphate de pH 6,4 et d'un passage d'une solution de ClNa à 1 M, trois fractions sont recueillies ; une protéase, une neurotoxine mêlée à un peu de protéase et un facteur anticoagulant.

WILLIAMS et ESNOUF (1961 ref 207) ont purifié et enrichi 12 fois la coagulase du venin de Vipera russellii par chromatographie sur la DEAE -Cellulose. Le développement du chromatogramme était fait d'abord au moyen d'un tampon 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1 : 3 diol-phosphate 0,01 M de pH 8,5-7 et

6 puis avec une solution de ClNa à différentes concentrations : 0,15 M - 0,50 M et 1 M. La fraction recueillie à la molarité 0,15 M contenait la majeure partie de l'activité coagulante du venin. Cette fraction homogène à l'électrophorèse, était composée de 2 substances de constantes de sédimentation différentes, celles-ci ont été séparées par ultra-centrifugation à 10 000 g pendant 40 heures.

* * * * * Gel de Dextrane et de Sephadex :

Gel de dextrane :

Le gel de dextrane convient d'après PORATH, à la séparation des protéines de faible poids moléculaire ; c'est pourquoi BJORK et PORATH (1959 -ref 11) l'ont essayé pour extraire certaines enzymes du venin d'Hemachatus hemachates. Le gel est mis à gonfler dans le tampon "THAM-ClH" de pH 7,6, il est ensuite versé dans la colonne de verre. La solution de venin tamponnée au THAM y est introduite à son tour. L'élution est faite avec le même tampon. Quatre fractions ont ainsi été séparées de ce venin. La première fraction contenait la phosphodi-
estérase, l'acétylcholinestérase et la 5'nucléotidase ; la
lécithinase est recueillie dans la deuxième fraction.

Ces auteurs préconisent l'emploi de ce gel comme étape intermédiaire à la chromatographie sur DEAE-cellulose pour séparer la lecithinase de la cholinestérase.

b) Sephadex 75 :

Le gel de Sephadex 75 équilibré avec un tampon acétate de sodium 0,005 M de pH 5,8 a permis à BJORK (10) de purifier 23 à 25 fois, sans les séparer toutefois, la phosphodi-
estérase

et la 5'nucléotidase du venin d'Hemachatus préalablement isolés du venin total par passage sur colonne de DEAE-cellulose.

Conclusion :

De ce long exposé sur les différentes méthodes employées pour fractionner et purifier ou enrichir les éléments constitutifs des venins, il est très difficile d'affirmer qu'une technique employée seule soit nettement supérieure aux autres, car aucune d'elles à une exception près, n'est capable de donner un principe actif parfaitement pur. D'autre-part si nous considérons les problèmes du fractionnement du point de vue de la production de quantités de produits enrichis, sinon purifiés, suffisantes pour permettre de faire les nombreuses expériences que comporte une étude approfondie des propriétés physico-chimiques ou biologiques, certaines de ces méthodes sont inapplicables, telles sont l'électrophorèse "libre" ou sur papier et la chromatographie sur papier, qui ne sont en somme que des épreuves d'exploration et de contrôle.

Les méthodes mixtes, c'est-à-dire les méthodes dans lesquelles on utilise successivement par exemple des précipitations fractionnées salines et des séparations électrophorétiques ou chromatographique, offrent de nombreux avantages car leur association, augmentant le nombre des paramètres que l'on peut faire varier, assure à chaque stade le départ d'un ou plusieurs facteurs et simplifie de ce fait le mélange complexe d'origine.

Les venins ne sont certes pas les seules substances protéiniques dont le fractionnement représente beaucoup de difficultés ;

mais du fait de l'extrême complexité de leur composition, du grand nombre d'enzymes qu'ils contiennent dont les constantes physico-chimiques sont souvent très voisines (point-isoelectrique, poids moléculaire peu élevé, etc...) et de leur sensibilité aux variations de la température, du pH et aux effets destructeurs de certains ions, ce problème est particulièrement délicat à résoudre. On constate cependant que malgré leur manque de pureté les produits recueillis sont en général considérablement enrichis par rapport au matériel de départ et débarrassés de la majeure partie des protéines inertes, ce qui constitue quand même deux avantages non négligeables. Certains venins sont relativement plus faciles à fractionner que d'autres ; c'est ainsi que le venin de Naja naja, dont les principaux constituants sont assez résistants, la neurotoxine, la cardiotoxine et l'hémolysine ont été obtenues à l'état pur par précipitation, alors que dans les mêmes conditions opératoires le principe toxique du venin de Vipera aspis n'est pas isolé.

Ainsi, suivant la famille et même l'espèce ophidienne à laquelle appartient le serpent générateur du venin ; Elapidae ou Viperidae, le problème du fractionnement se pose différemment.

A la lumière des résultats obtenus, on constate également que selon le facteur désiré, une technique convient mieux que les autres : la chromatographie, par exemple, est une méthode de choix pour la séparation des enzymes telles que les diestérases. Chaque constituant représente donc un cas particulier et comme tel réclame très souvent un mode de fractionnement particulièrement adapté.

III ETUDE DES PRINCIPAUX PRINCIPES ACTIFS :

Il est désormais possible de dresser un inventaire des nombreuses substances composant les venins et de définir succinctement leurs diverses activités toxiques ou enzymatiques.

1° Les toxines :

L'activité létale est la propriété dominante des venins, elle est due à un ou parfois plusieurs facteurs toxiques, toujours distincts des activités enzymatiques.

Ces toxines peuvent être classées en plusieurs types dont les principaux et surtout les mieux connus sont les neurotoxines, la cardiotoxine, la crotamine et la crotactine.

a) Les Neurotoxines :

Le principe actif majeur de la plupart des venins d'Elapidae et de certains Viperidae (*Echis*, *Vipera palestinae*, *Crotalus terrificus*) est une toxine neurotoxique, responsable des phénomènes paralytiques causés par le venin total. Dès 1872 BRUNETON et FAVRER (26) assimilent les propriétés physiologiques du venin de *Naja naja* à celles du curare. Cette opinion fut confirmée ultérieurement par de nombreux auteurs. Cependant différentes hypothèses ont été émises sur l'origine de ces phénomènes ; pour certains auteurs, il s'agirait d'une atteinte des centres nerveux, pour d'autres il se ferait un blocage de la conductivité nerveuse au niveau des ramifications neuromusculaires. Dans le but de clarifier ce problème P. GUYOT et P. BOQUET (103) ont repris en 1960 les expériences commencées par Elliott (64) en 1904 et étudièrent l'action du venin de *Naja nigricollis* sur le lapin. Ces auteurs constatèrent que les symptômes dif-

férent selon que le venin est inoculé par la voie intraveineuse ou intracérébrale. Par la voie veineuse, on observe le tableau clinique classique de la paralysie progressive des membres, des muscles du cou, du diaphragme et l'arrêt respiratoire. Alors que si le venin est injecté au voisinage de la "Corne d'Ammon", c'est au contraire les centres nerveux qui sont atteints avec des alternances d'excitation et de dépression, sans apparition de symptômes de curarisation. Il se pourrait donc, en définitive, que le venin agisse à la fois sur les centres nerveux et sur les jonctions neuromusculaires, selon que la dose de venin employée est forte ou pas.

L'identité d'action entre le curare et le venin n'est d'ailleurs pas entière, car l'isochronisme n'est pas rétabli par les substances antagonistes du curare comme la spartéine et la strychnine. La neurotoxine du venin de *Naja naja* a été isolée par GHOSH, DE et CHAUDHURI (84-85) en 1938-1941 par des précipitations fractionnées avec le sulfaté d'ammonium, le sulfate de sodium, l'alcool méthylique suivies d'adsorption sur des gels de silice ou d'acide tungstique. Le produit obtenu était 16 à 17 fois plus actif que le venin d'origine. La dose minimum mortelle pour la souris de 20 g est d'après ces auteurs de 0,022 mg/g, son poids moléculaire est de l'ordre de 2 500 à 4000, elle est dialysable et son point isoélectrique est à pH 11. A l'électrophorèse à pH 6,8 et à pH 8,6 elle émigre rapidement vers la cathode. L'analyse élémentaire révèle la présence de carbone, d'hydrogène, d'azote et de soufre. La neurotoxine est thermostable, puisqu'elle ne perd que 15 à 20 % de son activité

par chauffage à 90°C pendant 30 minutes. Les agents chimiques tels que le bisulfite de sodium, les sels de cuivre et la cystéine en milieu acide l'inactivent par destruction probable des ponts -S-S- qui se trouvent dans sa molécule. D'autres neurotoxines ont été isolées des venins de Naja flava (MICHEEL, 1936) et de Notechis scutatus scutatus (DOERY-(60)- 1958).

b) Cardiotoxine :

Le venin de Naja naja provoque chez le sujet d'expérience, parallèlement à ses effets curarisants, un ralentissement du rythme et une augmentation passagère des contractions ventriculaires du coeur perfusé avec une solution très diluée de venin. L'électrocardiogramme révèle la présence de nombreuses lésions du tissu cardiaque, notamment une diminution de la conduction entre l'oreillette et le ventricule. Ce comportement rappelle celui de la digitaline, sans cependant lui être identique puisque la toxine responsable de ces phénomènes n'est pas éliminable par lavage. KELLAWAY et TRETHERWIE en 1940 (122) ont résolu ce problème en invoquant l'action de l'acide adénylique, qui provient de la décomposition dans les tissus de l'acide adénosine-triphosphorique, substance essentielle qui intervient dans le métabolisme des glucides pendant la contraction musculaire, et qui cause les mêmes perturbations cardiaques. Cette toxine a été isolée par SARKAR en 1947 (184-185) sous le nom de "Cardiotoxine" du venin de Naja naja par précipitations fractionnées avec le sulfate de sodium et le chlorure de sodium. Celle-ci n'agit pas sur le système nerveux, ce qui la différencie de la neurotoxine. Elle est assez stable à la chaleur, son poids moléculaire est d'environ 46.200 et son point isoélectrique est à pH 8,7. Des effets cardiotoxiques ont été également

enregistrés avec les venins de Naja flava, de Naja haje, de Naja nivea, de Crotale et de Vipera ammodytes.

c) Crotamine :

Le venin de Crotalus terrificus terrificus collecté dans les Etats du Sud du Brésil et du Nord de l'Argentine, et uniquement de cette zone contient une toxine basique : " la Crotamine" qui n'existe pas dans le venin de ce même Crotale provenant des autres régions du Brésil.

La Crotamine se caractérise par son pouvoir convulsisant elle provoque sur la souris la paralysie des extrémités postérieures une gêne respiratoire et la mort qui s'accompagne de la rigidité du corps de l'animal, contrairement à ce qui se produit avec la Crotactine.

La contraction du muscle masseter de rat soumis à l'action de cette toxine permet de la comparer à la Vératine.

J.M. GONCALVES (96) en 1956 isola et purifia la Crotamine par chromatographie sur colonne de résine carboxylique IRC50 Sa toxicité sur la souris éprouvée par la voie intra-péritonéale est de 4 g ; à pH 7,7 elle émigre vers la cathode, son point isoelectrique est à pH 10,3 et son poids moléculaire est de 10 000 à 15 000 - ce qui la rend dialysable.

d) Crotactine :

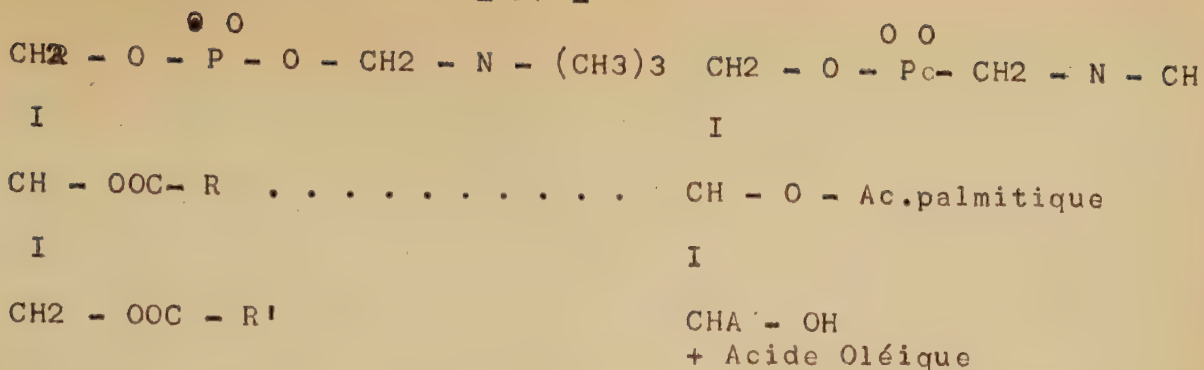
SLOTTA et FRA ENKEL-CONRAT en 1938 (190-191) isolent du venin de Crotalus terrificus terrificus par précipitation au sulfate d'ammonium une substance toxique qu'ils nommèrent "Crotoxine". Celle-ci cristallisait en solution aqueuse acidulée par l'acide acétique en présence de pyridine. Considérée d'a-

1920 :

bord comme une substance pure de poids moléculaire de 30 000 et de point isoélectrique à pH 4,7, la ^{se} crottoxine révéla être composée d'une toxine et d'une phosphatidase A. C'est en 1955 que NEUMANN et HABERMANN (153) séparèrent ces deux facteurs par chromatographie sur Amberlite IRC 50. Ce principe toxique qui reçut le nom de "Crotactine" augmente la perméabilité de la peau, sans posséder d'activité hyaluronidasique, provoque la contraction des muscles lisses et abaisse la pression sanguine. A l'électrophorèse faite à pH 7,7 elle émigre vers l'anode, contrairement à la crotamine, qui à ce pH se déplace vers la cathode. Son poids moléculaire n'a pas été déterminé, seul son point isoélectrique est connu et se trouve au voisinage de pH 4,3.

2° Hémolysine - (Lécithinase, Phosphatidase, Phospholipase).

Les venins sont hémolytiques pour les globules rouges de la plupart des mammifères. FLEXNER et NOGUCHI (1902 - ref 72) constatent que les hématies sont lysées par le venin de Naja naja lorsqu'elles sont en présence de sérum, alors que débarrassées de toute trace de sérum, elles ne sont pas détruites. La même année Calmette, puis Kyes et Sachs (1902-1903-Ref 13D) remarquent que la lécithine possède également cette propriété activante. C'est enfin Delezenne et Ledebt qui en 1911, découvrent le mécanisme de ce phénomène et qui isolent la substance hémolysante : La Lysocithine. Cette Lysocithine est l'ester mono-palmito-phosphorique de la choline, qui provient du départ d'une molécule d'acide oléique de celle de la lécithine sous l'action de l'hémolysine d'après le schéma suivant :



Cette diéstérification est le fait de la phosphatidase A que l'on rencontre dans la plupart des venins hémolytiques de provenance ophidienne. Il existe deux autres phosphatidases : les phosphatidases B et C. La première se trouve dans le venin de guêpe et chez certains champignons, elle arrache la molécule d'acide palmitique et non celle d'acide oléique ; la phosphatidase C est présente dans le venin de *Bothrops alternata* en même temps que la phosphatidase A, elle scinde la molécule de lécithine en un diglycéride et en phospho choline.

L'hémolyse peut se faire soit directement, soit indirectement. L'hémolyse indirecte n'est obtenue qu'en présence de lécithine (lécithine ou sérum) et correspond au processus décrit plus haut ; elle est provoquée par la majeure partie des venins. Cependant, les venins de Naja naja et de Denisonia sont capables de lyser directement les hématies sans le concours de lécithine ; cette anomalie a été étudiée par TURNER (1957 -Ref 201). Cet auteur en donne l'explication en démontrant que les hématies qui sont lysées directement, tel est le cas des hématies humaines et de celles de lapin, contiennent dans leur stroma de la lécithine, alors que celles de mouton, de chèvre et de boeuf n'en contiennent pas ou peu. Donc d'après Turner, ce phénomène dépendrait non du venin mais de l'espèce de l'hématie.

La phosphatidase A du venin de Naja.naja a été isolée par DE sous forme cristallisée II fois plus active que le venin brut, par précipitation fractionnée avec le chlorure de sodium, suivies d'adsorption soit sur acide tungstique, soit sur hydroxyde d'aluminium, ~~Cu~~ ou sur Hydroxyde ferrique. Son poids moléculaire est de 33 000, elle n'est donc pas dialysable, sa formule moléculaire serait d'après Slotta (192) : $C_{1350} H_{2060} O_{525} N_{380} S_{40}$ et son point isoélectrique est à pH 8,55 - 8,61. Son activité est maximum à pH 7 à 38°C. A l'électrophorèse, elle émigre lentement vers la cathode ; les U.V. la détruisent rapidement, mais elle résiste à l'ébullition pendant 10 minutes. Les agents oxydants l'inactivent et les substances réductrices comme le glutathion, la cystéine et l'hydrogène sulfuré restaurent son activité.

La phosphatidase A du venin d'Hémachatus haemachates a été isolée par BJORK (10) par chromatographie sur DEAE-Celulose et sur phosphate de calcium, son taux de purification était de 7.

Le chromatogramme de la phosphatidase A du venin de Naja naja révèle après hydrolyse la présence d'arginine, de cystéine, d'histidine, de lysine, de tyrosine, de méthionine et de tryptophane.

3° Cholinestérase :

Une estérase hydrolysant ,l'acétylcholine a été découverte en 1938 par IYENGAR et GHOSH (118) dans le venin de Naja naja. Depuis les travaux de ZELLER et d'AUGUSTINSON, on sait que la plupart des venins d'Elapidae contiennent cette

estérase et que les venins de Viperidae en sont dénués. X

En 1939, GHOSH émettait l'hypothèse que les effets paralysants du venin de Cobra étaient dûs à la cholinestérase, cette hypothèse est à présent rejetée puisque la neurotoxine et la cholinestérase ont été séparées l'une de l'autre.

Avant la découverte de la cholinestérase ophidienne, deux types de cholinestérases étaient connus ; le type sérique, trouvé dans le sérum et le pancréas et le type érythrocytaire, trouvé dans les érythrocytes et le cerveau. La cholinestérase contenue dans les venins de Naja naja et de Bungarus fasciatus fut purifiée par précipitations fractionnées avec le sulfate de sodium et le sulfate d'ammonium par CHAUDHURY (39) en 1944, ce qui permit d'établir une comparaison avec les deux premiers types.

BJORK (10) en 1960 isola du venin d'Hémachatus haemachates par chromatographie sur colonne de DEAE-Cellulose et de phosphate de calcium une cholinestérase dix fois plus active que le venin brut.

C.YANG (212-213) la même année sépare la cholinestérase des venins de Bungarus multicinctus et de Naja naja atra par électrophorèse sur colonne d'amidon.

D'après ZELLER (1948 -Ref.219) le venin le plus riche en Ophio-cholinestérase serait celui de Bungarus coeruleus et le plus pauvre celui de Naja nigricollis.

L'hydrolyse de l'acétylcholine se fait suivant le processus que voici et la réaction est irréversible :



TABLEAU n° 4

Action des S-E et O cholinestérases sur différents esters de la choline.

	:Acétyl- :choline	:Acétate :d'Ethyle	:Butyrate :d'éthyle	: Tributyrine :	: Acétyl-B : méthyl-choline	:Benzol :choline
in- ase	+	%	+	+	0	+
in- ase	+	0	0	0	+	0
in- ase (s)	+	+	+	+	+	0

TABLEAU N° 5

pH optimum pour les trois types de cholinestérases :

S-Cholinestérase	: Echolinestérase	: O-Cholinestérase
8,5	7,5 - 8	8,4

TABLEAU N° 6

	Caféine	Morphine	Esérine	Physostigmine	Optimum de concentration en acétylcholine
lin- ase	0	++	0	0	$0,25 \times 10^{-4}$
lin- ase	++	++			$0,25 \times 10^{-6}$
lin- ase	++	++	++	++	$0,25 \times 10^{-6}$

D'après ces résultats, dans lesquels on constate que la cholinestérase ophidienne possède certaines propriétés des deux estérases sérique et érythrocytaire, on ne peut l'assimiler complètement ni à l'une, ni à l'autre ; c'est pourquoi, BOVET (24) qui fait remarquer son caractère non-spécifique, propose le nom d'Acétylase ou d'Acétyl-estérase au lieu de cholinestérase pour cette enzyme, SLOTTA l'appelle "Opho-cholinestérase". Il se pourrait que celle-ci ne soit qu'un mélange de S et de E-cholinestérase comme le fait se produit dans les glandes salivaires des mammifères.

L'ophio-cholinestérase est stable en solution de Ringer contenant du bicarbonate, alors qu'elle est rapidement inactivée en solution aqueuse ; la dialyse l'inactive également ; elle est thermolabile, son point isoélectrique est à pH 5,5 - 5,9.

Les ions calcium, magnésium, manganèse renforcent son pouvoir hydrolysant, mais celui-ci est inhibé par la physostigmine, l'érésine, les uréthanes, la choline, la muscarine, la

généserine, la nicotine et la myristicylcholine.

N.B. Contrairement aux dires de ZELLER et d'AUGUSTINSSON, nous avons déterminé avec certitude la présence de l'Ophio-cholinestérase dans un échantillon de venin d'Echis carinata provenant d'Ethiopie

4° Anticholinestérase :

LEE, CHANG et KAMIJO en 1956 (132) découvrent dans le venin de Naja naja atra de Formose une anti-cholinestérase qui coexiste avec la cholin-estérase et qui en contrarie l'activité. Ses effets sont inhibés par les ions magnésium, calcium, potassium, sodium et ammonium; La cystéine, le glutathion réduit, le citrate de sodium et l'acide cyanhydrique. Elle est détruite à 60°C et inactivée par la dialyse. Son activité est maximum à pH 6 -8,5.

5° Phosphoéstérases:

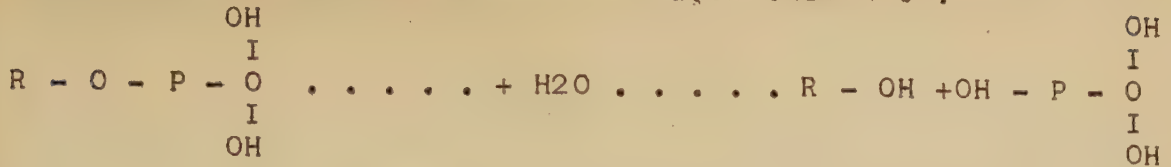
Les phosphoéstérases contenues dans les venins constituent un ensemble important d'enzymes, dont le rôle n'est pas encore entièrement élucidé, mais qui se montrent particulièrement actives. Elles se répartissent en trois groupes :

- Les Phosphomonoestérases,
- Les Phosphodiéstérases,
- Les Pyrophosphatases.

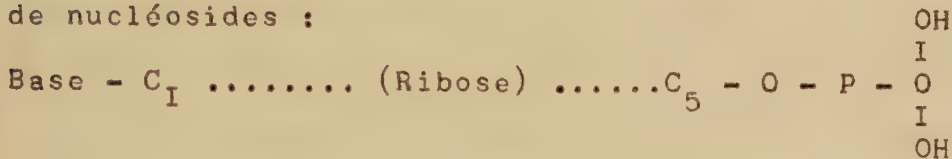
a) Les phosphomonoéstérases :

Les Phosphomonoéstérases sont rencontrées principalement dans les venins d'Elapidae ; FOLLEY et KAY (74) en 1936, puis ROCHE et COURTOIS (180) en 1944, les classent en quatre types suivant leur pH d'activité optimum, leur substrat de prédilection et leur activation ou leur inhibition. par les ions magnésium .

Leur action peut se schématiser de la façon suivante:



A ce groupe se rattache la 5-Nucléotidase, que l'on trouve dans la plupart des venins d'Elapidae et de Viperidae. Cette enzyme attaque les nucléotides et les réduit au stade de nucléosides :



La 5'nucléotidase n'hydrolyse que les nucléotides substitués en position 5, tels que l'adénosine - 5 - Phosphate, l'Inosine-5-phosphate, le ribose-5-phosphate, etc... Les ions magnésium^m, calcium^m, manganèse et cobalt renforcent son activité, tandis que les ions zinc et nickel l'inhibent. L'optimum d'activité est à pH 8,5 - 9,9. BJORK (10), en 1961, l'a isolé à partir du venin d'Hemachatus haemachates par chromatographie sur DEAE-Cellulose et passage sur gel de Sephadex 75 et sur DOWEX 50. Le produit obtenu ainsi était 25 fois plus actif que le venin d'origine.

b) Phosphodiésthérases :

Les phosphodiésthérases sont plus répandues et surtout mieux connues du fait de l'intérêt qu'elles représentent pour l'étude de la structure des acides nucléiques.

Leur action sur le substrat peut se résumer dans le schéma suivant :

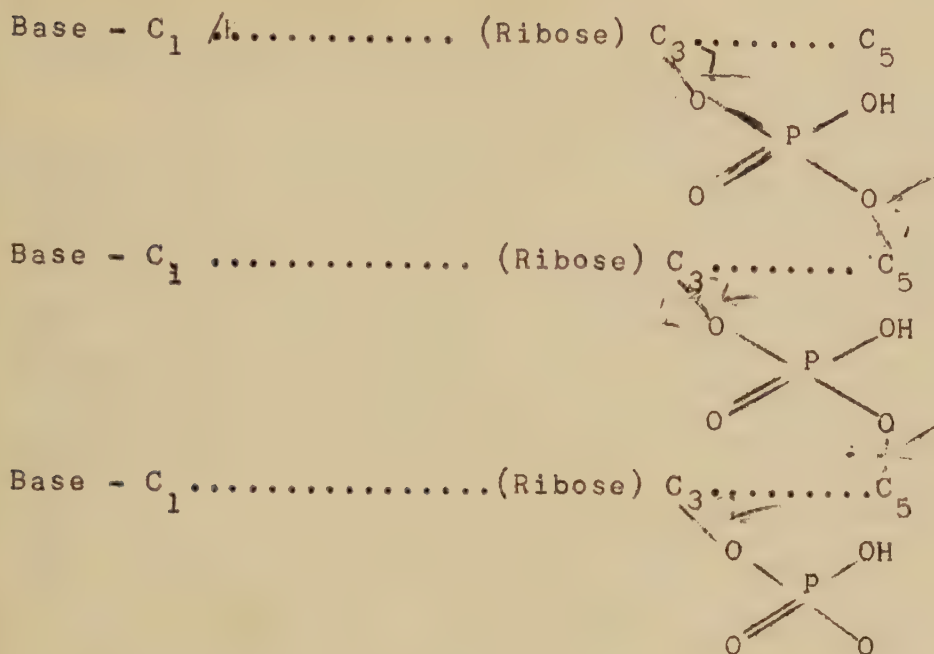


SINSHEIMER et KOERNER (189) en 1952, obtiennent la phosphodiestérase du venin de Crotalus adamanteus à l'état presque pur par précipitation acétonique. En 1955 PRIVAT DE GARILHE (171) sépare celle des venins de Vipera russellii et de Crotalus adamanteus par adsorption sur cellulose, ou par précipitation acétonique ou encore par chromatographie sur colonne d'Amberlite IRC 50. BJORK (10) en 1961 purifie 125 fois la diestérase du venin d'Hemachatus haemachates par chromatographie sur DEAE-Cellulose, suivie de filtration sur gel de Sephadex 75 et Dowex 50. Par cette méthode, l'enzyme est récupérée à 45 % de son activité initiale dans le venin brut et la 5-nucléotidase en est complètement séparée.

L'ophiodiestérase a son maximum d'activité à pH 8,5-9 pour tandis que/la phosphodiestérase hépatique et rénale l'optimum est à pH 7. Parmi ces phosphodiestérases, certaines sont capables d'hydrolyser les ribonucléotides et d'autres les déoxyribonucléotides.

Selon C.C.YANG et S.TAKEMURA (217) 1958, alors que la ribonucléase pancréatique scinde en chaînes de longueurs variables les acides ribonucléiques (VOLKIN et COHN -1953)Ref.202 (BROWN et TODD - 1951 - Ref.25), sans libérer le phosphore sous sa forme minérale, la ribonucléase des venins coupe en un premier temps la liaison qui existe entre l'atome de carbone en position 3 de la molécule de ribose et la molécule d'acide phosphorique donnant naissance à des nucléotides où l'atome de carbone en position 5 du ribose est lié à cette molécule d'acide phosphorique. En second temps, cette liaison est également détruite

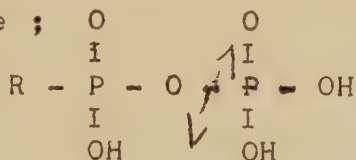
par la 5'nucléotidase, libérant ainsi l'acide phosphorique et des nucléosides.



Ces nucléosides peuvent être à leur tour scinder en une seule molécule de base, purique ou pyridimique, et en sucre par des nucléosidases.

c) Pyrophosphatases :

Les pyrophosphatases existent dans tous les venins, à l'exception de celui de Bungarus multicinctus, d'après YANG et CHANG (1954 - Ref.218) la déphosphorylation se fait de la manière suivante :



L'adénosine-triphosphatase est une pyrophosphatase. Celle de certains venins n'est active qu'en présence des ions magnésium ou calcium, tel. est le cas des venins d'Acanthopis antarticus et Dendraspis angusticeps. Son optimum d'activité est à pH 8,3. Le coenzyme I (Diphosphopyridine nucléotide)

serait selon YANG et CHANG, décomposé en adénosine monophosphate et en nicotamide mononucléotide par la pyrophosphatase ophidienne.

6° Facteurs de Diffusion :

Les venins contiennent tous un facteur de diffusion comparable à l'hyaluronidase découverte par DURAN-REYNAL (61) dans l'extrait testiculaire de lapin. Cette enzyme, qui a pour propriété de dépolymériser l'acide hyaluronique du tissu conjonctif, n'est pas toxique par elle-même, mais elle favorise la diffusion des éléments nocifs d'un venin. Ces effets sont neutralisés en partie par le sérum antivenin homologue, et parfois aussi par un sérum hétérologue, c'est ainsi que l'hyaluronidase du venin de *Naja haje* est inhibée par son anti-sérum, mais aussi par les sérums anti-venins de *Naja naja* et d'*Echis carinata*. Il est à remarquer qu'il n'y a aucune relation antigénique entre l'hyaluronidase testiculaire d'origine bovine et l'hyaluronidase ophidienne. P. BOQUET (22-23) en 1958 a déterminé et comparé l'activité hyaluronidasique de 15 venins appartenant aux familles des Viperidae et des Elapidae ; parmi ceux-ci, le venin de *Dendroaspis viridis* est le plus actif avec 64 TRU par mg de venin sec, alors que celui d'*Ancistrodon piscivorus* n'en contient que 16/TRUmg.

L'hyaluronidase ophidienne n'a pas été isolée jusqu'à présent, à l'état pur, cependant MADINAVEITIA (135) en 1941 aurait enrichi son activité par précipitations avec le sulfate d'ammonium. L'optimum d'activité de l'enzyme est à pH 4 - 5 ; elle est détruite à 60°C. D'après ZELLER (1948) (219) la dépolymérisation des mucosaccharides se ferait en plusieurs phases et à chacune

Les ferments protéolytiques sont nombreux et très actifs. Ils seraient responsables des phénomènes nécrotiques provoqués par l'envenimation. Ces enzymes interviennent successivement à chaque stade de la dégradation des protéines d'après le processus suivant :



Les protéinases agissent d'une façon comparable à celle de la trypsine ; Bergmann (8-9) les appelle les "Endopeptidases". Les venins de Viperidae en sont particulièrement riches. Maeno (1959-Ref136) isole une alpha et une beta protéinase du venin de Trimeresurus flavoviridis par passage sur gel de phosphate de calcium. OHSAKA (1960 -Ref 158) sépare du même venin trois facteurs protéolytiques par électrophorèse sur colonne d'amidon

PPLEIDERER (1961-Ref 166) obtient également trois protéinases différentes (A B X) par chromatographie sur DEAE-Cellulose du venin de Crotalus atrox. Les venins de Vipera russellii, d'Echis carinatus, de Naja naja, et de Bungarus fasciatus liquéfient la gélatine et dégradent la caséine. L'optimum d'activité se situe entre les pH 7 et 8 à 50°C ; pour le venin de Bothrops jararaca le pH optimum est à 10. Une température de 60°C les détruit, les ions calcium et magnésium renforcent cette activité et les ions mercuriques et l'acide cyanhydrique l'inhibent.

b) Les peptidases :

Les peptidases, nommées par Bergmann "Exopeptidases", agissent sur les polypeptides, les carboxypeptides et aussi sur les dipeptides comme la glycylglycine, la glycyl-L-leucine et la chloracétyltyrosine. SLOTTA note que l'activité peptidasique est faible dans la plupart des venins.

Le groupe d'enzymes protéolytiques comprend également divers ferments, dont l'action, quoique secondaire, n'est pas négligeable. Les venins de Naja flava, d'Hemachatus haemachates, de Bitis arietans, de Bitis gabonica, de Bothrops jararaca, de Bothrops atrox et de Crotalus terrificus terrificus possèdent une collagénase qui dénature les préparations de collagène et l'azocoll. Son activité est maximum à pH 8,8 - 9,1.

Une "Rénine", ferment qui coagule le lait d'une façon similaire à la présure, se rencontre dans les venins de Bitis arietans et de Bitis gabonica, de Naja flava et d'Hemachatus Haemachates. Son action est favorisée par les acides faibles et les sels alcalinoterreux, elle est atténuée par les oxalates, les citrates, les fluorures, la filtration et le

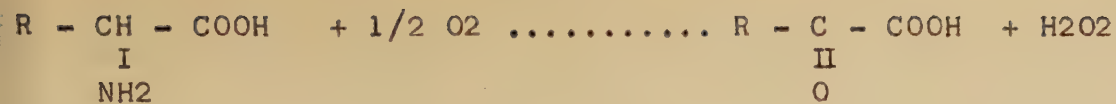
chauffage à 70°C.

Enfin les venins de *Bothrops atrox* et *jararaca* et de *Crotalus terrificus terrificus* incubés en présence de plasma, libèrent des globulines de celui-ci : la "Bradikinine", substance qui provoque la contraction des muscles lisses. ROCHA et SILVA en 1951 (179), puis HOLTZ et RAUDONAT (113) en 1956 et HENRIQUES (112) en 1960 l'ont partiellement isolée du venin de *Bothrops jararaca* par précipitations fractionnées au sulfate d'ammonium.

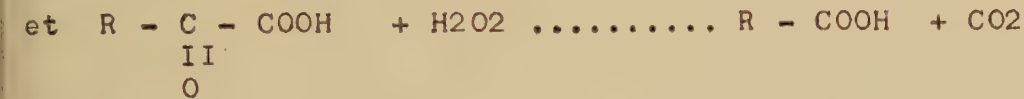
8° L-acide amino oxydases :

Des oxydases rencontrées dans les venins, la l-acide amino oxydase est la plus importante. Sa présence a été démontrée par SINGER (188) dans tous les venins colorés en jaune. Cette coloration jaune est due à la flavine-adénine-dinucléotide et ZELLER (219-220) en 1944, puis SINGER en 1950 établissent le parallélisme étroit qui existe entre la flavine et l'activité de la l-acide amino oxydase ; la flavine étant le groupement prostétique de l'enzyme. Les venins blancs, comme celui de la Vipère du Gers ne possèdent pas cette enzyme.

SINGER (188) isole en 1950 la l-acide amino oxydase du venin d'*Ancistrodon piscivorus* par chauffage à 73°C du venin en présence de leucine qui la stabilise, et adsorption sur gel de phosphate tricalcique à pH 6,5. Son poids moléculaire est de 62 000, son point isoélectrique est à pH 5,6 - 5,7 et son pH d'activité maximum est de 7,2 à 50°C. La désamination oxydative des acides aminés suit deux processus différents, selon que l'enzyme agit en présence de catalase :



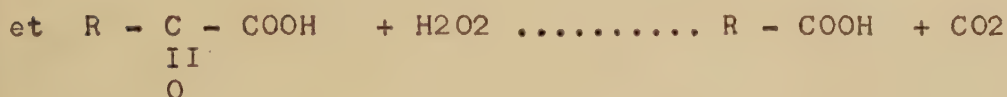
ou en l'absence de catalase :



L'ophio-l-acide amino oxydase n'agit que par les acides aminés lévogyres, dont le groupe carboxylique est libre, il faut également que l'atome de carbone en position alpha soit lié, en plus des groupements NH₂ et CO₂, à un autre radical. Un deuxième groupement NH₂ et COOH inhibe la réaction, de même qu'un excès de substrat. Cette enzyme diffère des l-acide amino oxydases extraites du rein de rat par Blanchard (13) et du *Proteus vulgaris* par STUMPF par le fait qu'elle n'est pas inhibée par l'acide cyanhydrique et l'alcool octylique, mais qu'elle est inactivée par les benzoates, les iodates et les peroxydes. Les venins de *Viperidae* sont en général plus riches en l-acide amino-oxydase (192) que ceux d'*Elapidae*. SLOTTA fait remarquer que l'enzyme est atoxique par elle-même, mais qu'il se pourrait qu'elle intervienne comme activateur des protéases et des peptidases au cours du processus d'envenimation. C'est ainsi que le venin de *Vipera aspis* blanc du Gers, qui ne contient pas de l-acide amino oxydase ne serait pas nécro-dant, contrairement au venin jaune ; il en irait de même pour le venin blanc de *Crotalus terrificus* *terrificus* d'Argentine.



ou en l'absence de catalase :



L'ophio-1-acide amino oxydase n'agit que par les acides aminés lévogyres, dont le groupe carboxylique est libre, il faut également que l'atome de carbone en position alpha soit lié, en plus des groupements NH₂ et CO₂, à un autre radical. Un deuxième groupement NH₂ et COOH inhibe la réaction, de même qu'un excès de substrat. Cette enzyme diffère des 1-acide amino oxydases extraites du rein de rat par Blanchard (13) et du *Proteus vulgaris* par STUMPF par le fait qu'elle n'est pas inhibée par l'acide cyanhydrique et l'alcool octylique, mais qu'elle est inactivée par les benzoates, les iodates et les peroxydes. Les venins de *Viperidae* sont en général plus riches en 1-acide amino-oxydase (192) que ceux d'*Elapidae*. SLOTTA fait remarquer que l'enzyme est atoxique par elle-même, mais qu'il se pourrait qu'elle intervienne comme activateur des protéases et des peptidases au cours du processus d'envenimation. C'est ainsi que le venin de *Vipera aspis* blanc du Gers, qui ne contient pas de 1-acide amino oxydase ne serait pas nécrodoant, contrairement au venin jaune ; il en irait de même pour le venin blanc de *Crotalus terrificus* *terrificus* d'Argentine.

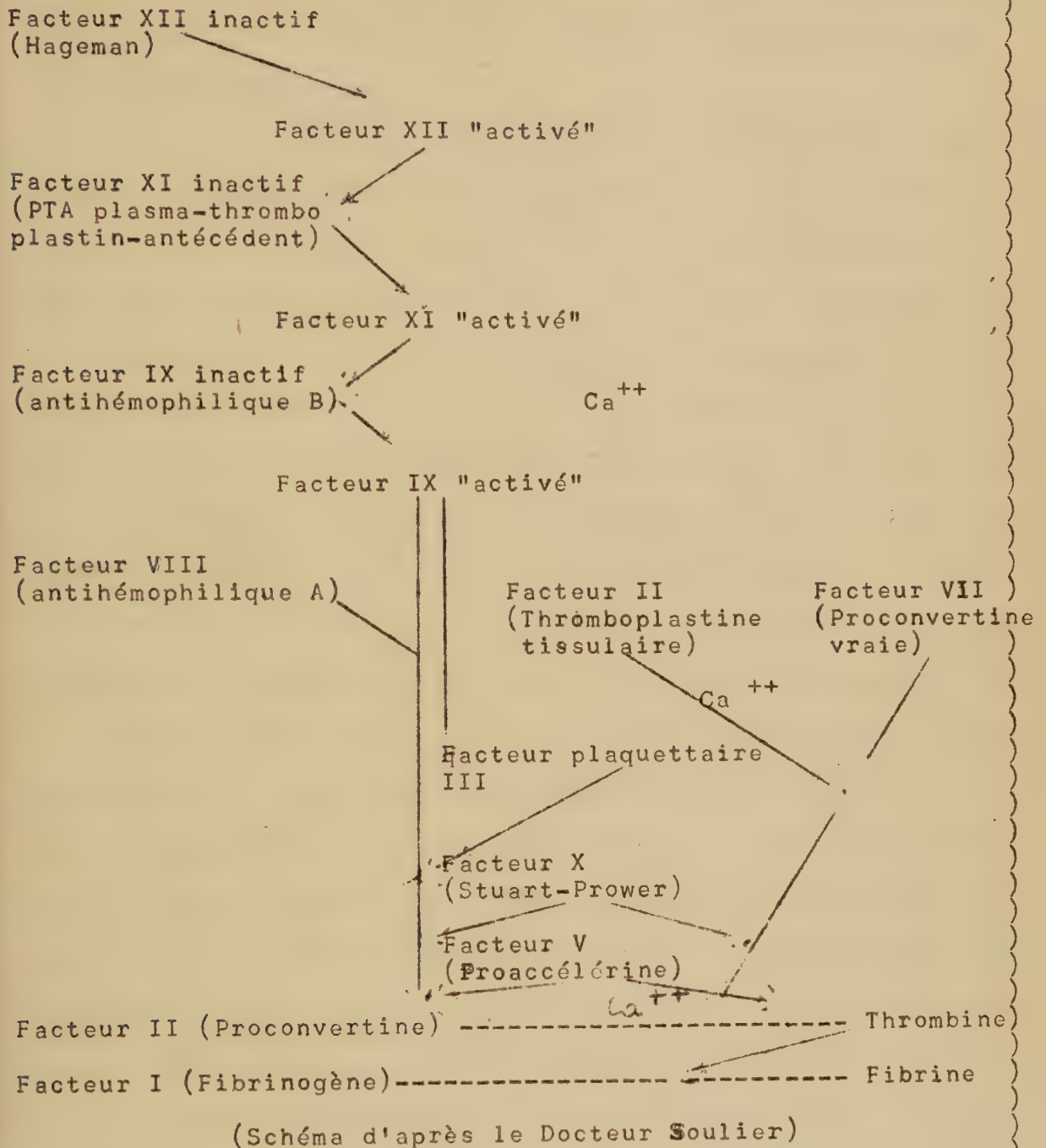
9° Enzymes intervenant sur la coagulation du sang :

Le mécanisme normal de la coagulation sanguine chez les mammifères et particulièrement chez l'homme est un des problèmes biologiques les plus délicats à résoudre. Constamment le processus de la coagulation est remis en question par de nouvelles découvertes, ce qui oblige à en remanier périodiquement le schéma. A l'heure actuelle, on admet la représentation suivante :

VOIR TABLEAU PAGE 98

TABLEAU N°7

Mécanisme de la coagulation sanguine :



Parmi les constituants des venins se trouvent des enzymes capables d'intervenir sur le cours normal de la coagulation à un stade donné ou même à différents stades, en

provoquant soit une activation, soit une inhibition, soit encore ces deux effets antagonistes suivant la dose de venin employée, comme la cas se produit avec les venins de Naja nigricollis et de Vipera aspis.

Ces perturbations peuvent être dues à des enzymes très différentes qui agissent de façon très diverses et souvent très complexes. C'est ainsi que les venins de *Bothrops atrox* et de *Bothrops jararaca* sont caagulants par le fait d'une part de l'action d'une enzyme fibrinolytique qui transforme le fibrinogène en fibrine à la manière de la thrombine et de la papaine et d'autre part à une coagulase proprement dite nettement distincte de la précédente comme l'ont démontré MICHL (146) en 1954, puis HOLTZ et RAUDONAT (113) en 1956 et ROSENFELD (182) en 1959. Cette coagulase a été obtenue en 1958 par HABERMANN (104), par précipitation acétonique du venin suivie d'une séparation électrophorétique sur papier ; elle était impure, mais dix fois plus active que le venin brut. HENRIQUES, FICHMAN et HENRIQUES (111) en 1960 purifièrent partiellement cette fraction coagulante par précipitations fractionnées avec le sulfate d'ammonium à des concentrations comprises entre 60 et 70 % de saturation et par électrophorèse sur colonne d'amidon. D'autres procédés ont également été utilisés par différents auteurs tels que l'adsorption sur des gels d'hydroxyde d'aluminium, de phosphate de calcium, de carbonate et de sulfate de baryum ou le passage sur des colonnes d'Amberlite IRC 50.

Les ions calcium activent modérément la coagulase, tandis que les ions cuivrique et mercurique l'inhibent.

Son optimum d'activité est à pH 7 ; à pH 6,2 le venin chauffé à 63°C voit son pouvoir coagulant diminuer de 25 % .

Le venin de Vipera russellii, qui est le type même des venins coagulants, exercerait son action au cours de la "thromboplastinoformation" d'une façon analogue à celle de la proconvertine vraie. GRASSET et SCHWARTZ (101) en 1955 ont séparé partiellement, de ce venin, l'enzyme qui en est responsable par électrophorèse sur papier, en même temps qu'une anticoagulase; la coagulase émigre vers l'anode alors que l'anticoagulase est attirée vers la cathode.

En 1961, WILLIAMS & ESNOUF (207) ont isolé cette coagulase par chromatographie ^{/sur colonne de DEAE-Cellulose et ultra-} à 100.000 g. Le produit ainsi obtenu ^{-centrifugation} était huit fois plus actif que le venin brut et son optimum d'activité se situe entre pH 7 et pH 9. C'est également par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose que KOCHWA (125) en 1960 a purifié le facteur anticoagulant du venin de Vipera xanthina palestinae et révélé la présence d'une coagulase qui, dans le venin total, n'est pas apparente.

Les venins d'Elapidae, et notamment celui de Naja naja, agiraient d'une toute autre manière, ils porteraient leur action sur les activateurs de la prothrombine qu'ils inhiberaient, ce qui expliquerait leur pouvoir anticoagulant. Le venin de Naja nigricollis posséderait également un principe coagulant dont les effets se font sentir lorsque le venin est employé à des doses^{es} . élevées.

10. Enzymes inhibitrices des enzymes respiratoires :

TABUET, ROUSSEAU et DUMATRAS (196) en 1933, puis CHAIN (37) en 1937 observèrent que de nombreux venins de serpents

exercent une inhibition importante de la glycolyse dans les préparations d'extraits musculaires et de la fermentation par les levures. Les venins de Notechis scutatus, Denisonia superba et de Bothrops atrox sont à ce point de vue particulièrement actifs. Cette inhibition est neutralisée par les sérums antivenins correspondants.

GHOSH et CHATTERJEE en 1948 étudièrent l'action du venin de Cobra sur des suspensions de cerveau de pigeon : l'oxydation des acides lactique, succinique, pyruvique et du glucose était ainsi inhibée à 90 %. Des résultats identiques ont été obtenus avec les venins de Vipera russellii, de Bungarus fasciatus et de Crotalus terrificus.

L'explication de ce phénomène est encore imprécise. Cependant il semble que les déhydrogénases qui ont pour coenzyme la diphosphopyridine nucléotide soient totalement inhibées, tandis que les autres sont très peu affectées. Il se pourrait donc comme le font remarquer KAISER & MICHL (119), qu'il se produise une inactivation ou une destruction de ce coenzyme I. Mais d'après NYGAARD (1953) il existerait un facteur de nature encore inconnue, peut-être un phospholipide qui serait intermédiaire dans le cycle de la fermentation entre les cytochromes B et C. Ce processus serait le suivant :

.../

TABLEAU N°8

<u>Mécanisme d'action des venins sur le cycle de la fermentation :</u>			
Succinate-dehydrogénase -----		Cytochrome B	
		I	
Diaphorase-----		Facteur intermédiaire	
(DPNH -Cytochrome C -			
Réductase)	VENINS	I	
		Cytochrome C	
		I	
		Cytochrome A	
		I	
		Cytochrome	02

Le principe responsable de cette inactivation serait la phospholipase A des venins.

11 Facteur provoquant la sphérocytose :

MITCHELL et REICHERT (1883 - Ref.150), KAUFFMAN (1889-Ref;120), puis FAHRAEUS (1929 - Ref. 65) et BERGENHEIM (1938 - Ref. 7) observent que les venins incubés en présence de plasma agissent sur les hématies de mammifères de telle façon qu'ils provoquent le phénomène de sphérocytose et qu'ils retardent la sédimentation globulaire. GITTER (1959 - Ref 93) ; DANON (47) ; BALOZET (1961 - Ref.3) ont étudié cette anomalie avec les venins de Vipera xanthina palestinae, Vipera lebetina, Vipera aspis, de Bitis, de Cerastes, de Crotalux atrox et de Naja naja, de Scorpions et d'autres animaux vénéneux. Ces auteurs concluent de leurs recherches :

1° Que ce phénomène est réversible, les hématies en état de sphérocytose reprennent leur forme discoïde et la sédimenta-

tion redevient normale après lavage.

2° Que l'action des venins sur les hématies est indirecte puisque la présence de plasma est indispensable.

3° Que seuls les venins hémolytiques en sont capables. De ce fait GITTER et BALOZET supposent que la lécithinase du venin libèrerait du plasma une substance responsable du phénomène, qui est différente de la substance hémolytique, car le chauffage des venins à l'ébullition pendant une heure, qui détruit une grande partie de l'hémolysine, n'atteint que faiblement le facteur provoquant la sphérocytose.



R E C H E R C H E S

P E R S O N N E L L E S

Après cette vue d'ensemble sur les facteurs toxiques et enzymatiques les mieux connus que l'on rencontre dans les venins de serpents et les méthodes de fractionnement par lesquelles il nous est possible de les obtenir dans un état de pureté suffisant pour permettre leur étude, nous exposerons les résultats que nous avons recueillis au cours de nos expériences.

Notre travail de recherche porte sur l'étude du venin de Naja naja, serpent appartenant à la famille des Elapidae dont la zone d'habitat s'étend depuis l'Inde jusqu'à la péninsule indochinoise. A ce venin nous comparons ceux de Naja nigricollis Elpidae d'Afrique orientale, d'Echis carinata, de Vipera xanthina palestinae, Viperidae d'Afrique et d'Asie Mineure et de Vipera aspis, vipère de France et d'Europe occidentale. Ces venins ont été fractionnés par électrophorèse sur gel d'Agar agar et sur chaque fraction séparée et éluée, nous avons étudié les différentes activités biologiques.

Cette étude comporte ainsi le repérage et le titrage des toxines, de la cholinestérase, de la phosphatidase A et de la l-acide amino-oxydase. Elle se poursuit par une série de réactions immunologiques en milieu gélifié : OUDIN (163), OUCHTERLONY (162) d'immunoélectrophorèses (99) et des épreuves de neutralisation des fractions obtenues par des sérums homologues et hétérologues afin de définir d'une part, le nombre et l'emplacement des antigènes et d'autre part d'établir le degré de parenté qui peut exister entre-eux. C'est en somme le problème fort important de la spécificité et de la paraspécificité des antigènes venimeux. que nous tentons d'éclaircir pour des venins de serpents pro-

venant de régions parfois très éloignées les unes des autres et surtout appartenant à des familles ophidiennes très différentes par leurs caractères zoologiques.

TECHNIQUES ADOPTEES POUR L'ETUDE DES DIVERSES PROPRIETES :

A Séparation électrophorétique sur gel d'Agar agar :

L'appareillage que nous avons utilisé est le même que celui de GARBAR et WILLIAMS (56-57-58-59).

Il consiste en deux cuves de leucoflex de 50 cm sur 8 cm et de 4 cm de profondeur dans lesquelles un courant continu de tampon arrive et s'évacue goutte à goutte pour éviter la polarisation des électrodes de platine. L'énergie électrique est fournie par un appareil redresseur de courant, pouvant débiter 400 milliampères et fournir une différence de potentiel de 500 volts.

Le choix de la gélose a une grande importance, car les produits commerciaux ordinaires contiennent de nombreuses impuretés qui interfèrent au cours des expériences en modifiant la vitesse de déplacement des protéines et en provoquant parfois des déchirures dans le gel. Pour ces raisons nous nous sommes servis des géloses "DIFCO" et "OXOID" qui sont purifiées et qui ont donné pleine satisfaction.

Le gel est obtenu en dissolvant à chaud 15 g d'Agar agar dans 1000 ml d'une solution de phosphates mono et disodiques tamponnée à pH 6,8 et de force ionique 0,056. Ce gel est coulé sur des plaques de verre de 50 cm de longueur sur 18 cm de largeur avec une épaisseur de 4 mm. Dans un sillon de 4 mm découpé sur la longueur de la plaque à égale distance des deux pôles,

on verse une solution de venin gélifiée à 1,5 %. Les connections électriques sont assurées par des bandes de papier filtre ARCHES n°304 de même longueur que la plaque de verre et de 5 cm de large recouvertes de gélifiantes, qui plongent dans les bacs contenant le tampon.

Nous avons opéré avec un courant électrique de 200 mA sous une tension de 75-80 V pendant 5 heures à +4°C. Après ce délai, une bande de gélose est prélevée, puis colorée à l'amido schwarz B, afin de déterminer la position des protéines séparées par électrophorèse. Le reste de la plaque de gel est segmenté en badelettes de 0,5 ou 1 cm de large. Chaque ruban est broyé par des billes de verre et élué par de l'eau physiologique. Après 12 heures de contact à + 4°C, le liquide surnageant est décanté ; puis remplacé par une nouvelle quantité d'eau physiologique qui est décantée à son tour 48 heures après. Afin d'extraire le maximum d'éluat de la masse du broyat, nous congelons celle-ci à -15°C pendant 12 heures ; à sa décongelation nous filtrons la masse entière sur filtre sans cendre DURIEUX. Les éluats recueillis sont ensuite lyophilisés et conservés à + 4°C. Les activités toxiques et enzymatiques sont alors étudiées dans chaque fraction.

Nous avons utilisé un tampon aux phosphates à cause de l'innocuité de ces sels pour les animaux d'expérience.

B Détermination et titrage de la toxicité :

Le titre en toxine létale pour chaque venin et pour chacune des fractions isolées est déterminé par l'injection à des souris de 18 à 20 g de doses décroissantes du produit à titrer.

Vue notre pauvreté en toxine recueillie au cours de nos fractionnements, nous avons été obligé de prendre pour titre la dose minimum mortelle 100 %, au lieu de la dose 50 % habituellement utilisée.

C Epreuve de neutralisation par des sérums spécifiques et hétérologues, d'après la technique d'Ipsen ; (117)

Cette méthode consiste à rechercher la quantité de venin que peut neutraliser 1 ml de sérum antivenimeux. L'épreuve de neutralisation se fait dans les conditions suivantes ; on détermine préalablement la dose minimum mortelle du venin pour la souris de 18 à 20 g par inoculation intraveineuse. On procède ensuite au titrage même par injection de mélanges composés d'une dose fixe de sérum et de doses croissantes de venin, préparés extemporanément. On établit alors un graphique dans lequel on porte en abscisse la dose de venin et en ordonnée la dose de sérum utilisée. La mort ou la survie des animaux d'expérience est enregistrée sur une période de 24 heures et les résultats sont pointés dans ce système de coordonnées. On obtient ainsi une droite préliminaire que l'on complète par d'autres points obtenus de la même façon avec d'autres quantités fixes de sérum. La courbe définitive est alors tracée. Celle-ci sépare la zone où toutes les souris sont mortes de la zone où toutes les souris ont survécu. L'activité du venin pourra être calculée en choisissant deux points sur la ligne de neutralisation. La différence entre les quantités correspondantes de venin est divisée par la différence des quantités correspondantes de sérum."

$$\frac{V^2 - V^1}{S^2 - S^1} = \text{quantité de venin neutralisé par ml de sérum}$$

D Détermination de l'activité cholinestérasique :

Reprérage des fractions contenant la cholinestérase :

Technique de E. STEDMAN : (194)

La méthode est basée sur le dosage de l'acide acétique libéré par l'enzyme après l'incubation du venin, ou de la fraction étudiée, avec une solution d'acétylcholine.

Conditions opératoires :

Dans un Erlenmeyer de 250 ml, on mesure 39 ml d'eau distillée, puis 10 ml de solution de chlorhydrate d'acétylcholine à 2°/100, 1 ml de solution de venin, ou de la fraction, et dix gouttes de solution alcoolique de rouge de crésol à 2°/100. Ce mélange ajusté à pH 8, c'est-à-dire lorsque le réactif coloré vire au rouge violacé, est porté au bain-marie à 38°C. On ramène à la teinte de départ si besoin est, par des additions de soude N/100, toutes les 5 minutes pendant 20 minutes. Le nombre de ml de soude trouvé pour la solution de venin, ou de fraction, soustrait du nombre de ml de soude trouvé pour un dosage à blanc donne la quantité d'acide acétique libéré exprimé en ml de soude N/100.

E Titrage du pouvoir hémolytique - Activité de la phosphatidase A.

Dans une série de tubes on mélange des doses croissantes de solution de venin, ou de fraction à étudier, à 0,5 ml de sérum de cheval, chauffé à 56°C (source de lécithine) et on complète le volume total à 1,5 ml avec de l'eau physiologique. Après une heure de contact au bain-marie à 37°C, on refroidit

les mélanges à la glace fondante et l'on ajoute 1 ml d'une solution refroidie de globules rouges à 5 %. La lecture des résultats se fait après 30 minutes de contact.

F Titration du pouvoir coagulant :

Après un titrage préalable, pour connaître la quantité de chlorure de calcium à ajouter au mélange de 0,5 ml de sérum normal de cheval chauffé à 56°C à 2 ml de plasma citraté de cheval pour obtenir la coagulation complète de celui-ci en 1 heure, on procède au titrage proprement dit. Ce titrage consiste à mélanger au plasma recalcifier à la dose fixée par titrage préalable, le sérum chauffé à 56°C et des dilutions du venin ou des fractions. Le tout est porté au bain-marie à 37°C et la lecture des résultats est faite après 15, 30 et 60 minutes de contact.

G Titration du pouvoir anticoagulant :

Ce titrage est très proche du précédent, dans un premier temps on détermine la dose de chlorure de calcium qui coagule complètement en 30 minutes le plasma et dans le second temps le processus est identique à celui de la coagulation; seule varie la dose de Cl_2Ca qui est ici plus forte.

H détermination et titrage de la l-acide amino oxydase :

Repérage des fractions contenant la l-acide amino oxydase :

TECHNIQUE DE O. SCHALES (186)

En l'absence de catalase la l-acide amino oxydase libère du peroxyde d'hydrogène de la l-leucine, en milieu tamponné à pH 7 par une solution de phosphate. Ce peroxyde est révélé par oxydation de la phénolphtaline en phénolphtaléine qui se recolore en rouge violacé.

I Détermination de la substance de Delezenne : (54) et de la substance rendant incoagulable le jaune d'oeuf.

Une substance que l'on rencontre dans certains venins, a la propriété de rendre incoagulable à la chaleur le jaune d'oeuf; d'autre part, le mélange venin-jaune d'oeuf incubé à 37°C pendant une heure et injecté à un lapin provoque chez celui-ci une chute de la pression artérielle parfois mortelle. Il se pourrait que ces deux propriétés ne soient l'effet que d'une seule et même substance, mais ceci n'a pas encore été prouvé avec certitude.

ETUDE DU COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE DE CHACUN DES 5 VENINS DANS

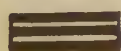
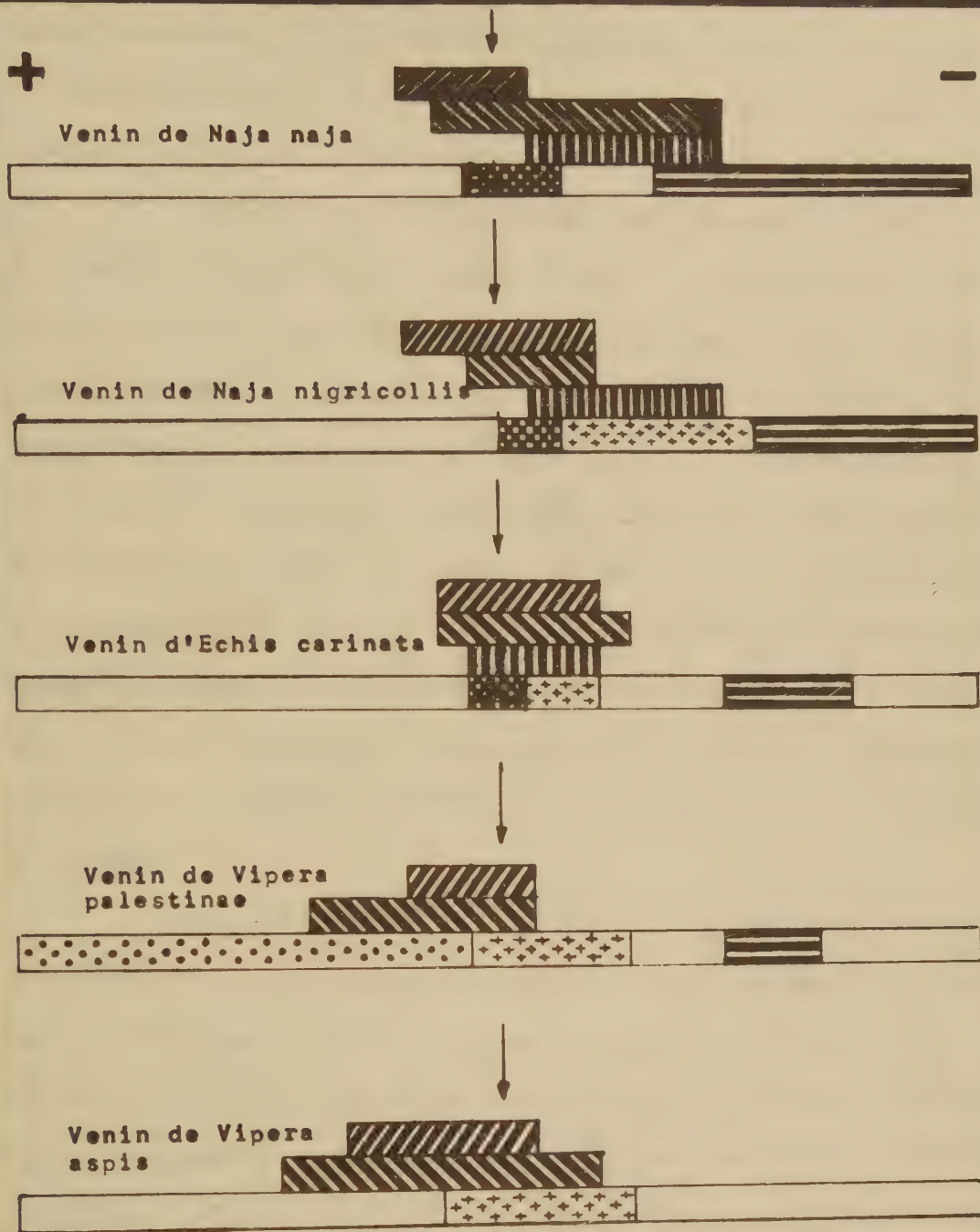
LES CONDITIONS INDIQUEES :

A° Venin de Naja naja :

Cinq fractions ont été séparées à l'électrophorèse, dont trois émigrent vers la cathode et deux restent stationnaires au point de départ.

La fraction cathodique la plus rapide, donc la plus basique, occupe la zone située de 2,5 à 7 cm du point de départ. Comme on peut le voir sur le graphique, la majeure partie de cette zone est dépourvue de toute activité enzymatique, seule la neurotoxine y est présente. Injectée par la voie veineuse à des souris et à des lapins, elle provoque la mort des animaux par paralysie respiratoire. 60 à 70 % de l'activité neurotoxique du venin de Naja naja sont ainsi récupérés ; la dose minimum mortelle pour une souris de 20 g éprouvée par la voie veineuse contient 0,46 μ g d'azote alors qu'une dose minimum mortelle du venin brut en contient 1,26 μ g, soit trois fois plus. Contrôlée par les méthodes

Graphiques des Séparations électrophorétiques à pH 6,8



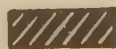
Neurotoxine



Toxine

Substance choq¹²

Cholinestérase



L-Acide amino-oxydase



Phosphatidase A



Coagulase

de diffusion en milieu gélifié de OUDIN et d'OUCHTERLONY cette fraction neurotoxique se comporte comme un antigène pur. A cette zone succèdent, étroitement imbriquées les unes aux autres, une cholinestérase, une phosphatidase A, puis une l-acide amino oxydase et enfin une seconde fraction faiblement toxique.

La cholinestérase n'est pas nocive, ce qui infirme l'hypothèse émise par IYENGAR (1938) et reprise par d'autres auteurs selon laquelle l'enzyme était responsable de la neurotoxicité. De même la phosphatidase A, n'est pas toxique, mais elle transforme la lécithine en lysolécithine hémolytique. A cette fraction se rattachent également l'activité anti-coagulante du venin à l'égard du plasma de cheval et le facteur de DELEZENNE qui rend incoagulable le jaune d'oeuf par la chaleur ; l'incubation du mélange de cette fraction avec le jaune d'oeuf à 37°C donne naissance à une substance, qui injectée à un lapin provoque une chute de la pression artérielle qui peut entraîner la mort de l'animal.

La l-acide amino oxydase et la seconde fraction toxique n'émigrent pas ou presque à pH 6,8, elles restent cantonnées au point de départ. Cette deuxième toxine se distingue de la neurotoxine par le fait qu'elle n'est pas paralysante, les symptômes qu'elle produit sont comparables à ceux de l'anaphylaxie et n'entraîne la mort de l'animal d'expérience qu'à des doses élevées du produit.

Nous n'avons pu déceler la présence d'hyaluronidase dans aucune des fractions extraites de la gélose.

B° Venin de Naja nigricollis :

Traité dans les mêmes conditions, le venin de Naja nigricollis est également séparé en cinq fractions ; celles-ci se répartissent à peu près dans le même ordre que pour le venin de Naja naja.

Une fraction basique émigre vers la cathode rapidement, c'est la neurotoxine que nous obtenons à l'état pur, elle se situe dans une zone comprise entre 4,5 cm et 7,5 cm du point de départ. Douée des mêmes propriétés physico-pathologiques que la neurotoxine du venin de Naja naja, la fraction ainsi recueillie représente 43 % de la toxicité totale du venin brut. Une dose minimum mortelle de cette neurotoxine pour la souris de 20 g éprouvée par la voie veineuse contient 0,8 μ g d'azote tandis qu'une dose minimum mortelle du venin brut en renferme 1,83 μ g, soit environ deux fois plus. Cette fraction est suivie de près par une autre fraction toxique, mélangée à la cholinestérase, à la phosphatidase A et à la l-acide amino oxydase.

La seconde fraction toxique, malheureusement impure représente une zone plus importante que celle qui lui correspond dans le venin de Naja naja, elle est également plus toxique quoique son activité paraisse due à une substance chaquante.

C° Venin d'Echis carinata :

Du venin d'Echis carinata nous avons extrait cinq fractions biologiquement actives, dont une toxine qui se déplace rapidement vers la cathode, à 6,5 cm du point de départ ; suivie d'une phosphatidase A, puis d'une cholinestérase, d'une l-acide amino oxydase et enfin d'une seconde fraction toxique ; ces trois dernières fractions se confondent partiellement.

La première fraction toxique représente environ le $1/5$ du nombre des doses mortelles contenues dans le venin brut et la seconde $1/3$. La fraction I éprouvée sur des souris par la voie intrapéritonéale est hémorragipare et paralysante par la voie veineuse. La fraction V provoque des troubles de la respiration, dont la nature est difficile à définir par la simple observation des symptômes sur la souris d'expérience. La présence d'une cholinestérase dans ce venin est assez anormale, car en règle générale tous les venins de Viperidae en sont complètement dénués.

D° Venin de Vipera xanthina palestinae :

Cinq fractions actives ont été dénombrées dans le venin de Vipera xanthina palestinae. Celles-ci se répartissent comme suit : une fraction cathodique, suivie de trois fractions chevauchant le point de départ et d'une fraction anodique.

La fraction basique, qui se situe dans une zone comprise entre 3,5 cm et 5,5 cm du point de départ, provoque sur la souris éprouvée par la voie veineuse des phénomènes paralytiques. Vient ensuite une autre fraction toxique (II), confondue partiellement avec les fractions hémolytiques et oxydasiques. Enfin vers l'anode émigration une troisième fraction toxique (III) qui est responsable de l'activité coagulante du venin.

Les fractions toxiques II et III semblent différentes l'une de l'autre par les manifestations pathologiques révélées à l'examen des viscères des souris éprouvées par la fraction II, c'est ainsi que nous ne trouvons pas de caillot sanguin dans le coeur et dans le foie, les intestins et les reins sont très fortement congestionnés, alors que la fraction anodique (III) est

faiblement toxique et qu'à l'autopsie on constate la présence de petits caillots dans le coeur et que les autres viscères paraissent normaux.

E° Venin de Vipera aspis :

Nous n'avons déterminé que trois fractions actives dans le venin de Vipera aspis ; toutes trois s'entremêlent en partie et se situe à proximité du point de départ. Nous trouvons une toxine ; puis une zone hémolytique assez large qui s'étend vers l'anode et enfin une l-acide amino oxydase qui se superpose à la phosphatidase.

La toxine obtenue est impure et sa nature est encore mal connue, cependant injectée à la souris par la voie veineuse elle cause la mort de l'animal en quelques minutes. A l'autopsie nous remarquons une forte congestion des intestins et un épanchement sanguin important, non hémolysé, dans la cavité abdominale, nous notons également que le coeur ne contient pas de caillot.

L'étude comparative du comportement électrophorétique des cinq venins en milieu tamponné à pH 6,8 permet de mettre en évidence plusieurs faits importants, qui sont :

1° L'émigration est nettement cathodique pour les constituants des venins d'Elapidae, alors que les constituants des venins de Viperidae se répartissent entre les deux pôles avec une tendance marquée pour l'anode. Ce fait, a été décrit depuis plusieurs années par de nombreux auteurs.

2° On remarque des dissemblances importantes entre les venins de serpents de même famille, c'est ainsi que les venins

de Naja naja et de Naja nigricollis, provenant d'une espèce ophidienne pourtant très proche dans l'échelle zoologique, ont leurs toxines distribuées différemment ; alors que la neurotoxine du venin de Naja naja constitue une zone homogène, celle du venin de Naja nigricollis forme avec la toxine choquante une masse qui s'étend largement du point de départ jusqu'à l'extrémité cathodique de l'électrogramme. De même, les venins de Vipera palestinae et de Vipera aspis se différencient par la présence de trois facteurs toxiques pour le premier venin et d'un seul pour le second venin. Quant au venin d'Echis carinata il est intéressant de noter qu'il constitue une sorte d'intermédiaire entre les venins d'Elapidae et ceux de Viperidae. Le fait que les venins de Naja naja, de Naja nigricollis et d'Echis carinata possèdent d'une part un facteur toxique dont les effets nocifs sont comparables à ceux d'un choc anaphylactique et d'autre part que leur toxicité principale est due à la neurotoxine permet d'émettre cette opinion. D'autres faits plus probants, que nous rapportons ultérieurement, la confirment. On peut également ajouter que l'isolement d'une cholinestérase à partir du venin d'Echis est, pour un venin de Viperidae, une anomalie rarement rencontrée ; puisque tous les auteurs sont unanimes pour affirmer que ce venin en est totalement dépourvu ; cette exception à la règle peut signifier que Echis carinata est vraiment à la limite des deux familles ophidiennes.

3° La séparation de la cholinestérase et de la neurotoxine des venins d'Elapidae prouve d'une façon indiscutable que la neurotoxicité est bien le fait d'une toxine et non celui de l'enzyme.

ETUDES IMMUNOLOGIQUES :

Nous avons procédé, d'une part, à la recherche d'une communauté antigénique possible entre différents venins provenant de serpents appartenant aux familles des Elapidae, des Viperidae et des Crotalidae. D'autre-part, nous avons voulu contrôler le degré de pureté des fractions que nous avons recueillies après séparation électrophorétique des venins de Naja naja de Naja nigricollis, d'Echis carinata, de Vipera xanthina palestinae et de Vipera aspis, et déterminer également si certaines de ces fractions ont quelques parentés entre-elles.

Pour cela nous avons utilisé la méthode de diffusion et de précipitation des antigènes et des anticorps en milieu gélifié ; et dans le dessein d'obtenir des résultats plus probants, nous avons employé deux techniques différentes ; celle de OUDIN en tubes et celle d'Ouchterlony en boîtes de Pétri ou sur plaques d'après la modification apportée par KAMINSKY⁽²²¹⁾.

A : Comportement antigénique de quelques venins par rapport à un même sérum antivenimeux :

Nous avons comparé le comportement immunologique de 19 venins provenant de trois grandes familles ophidiennes en les opposant à cinq sérums équine antivenins de Naja naja, d'Echis carinata, de Bitis arietans gabonica, de Vipera xanthina palestinae et de Vipera aspis.

Nous rapportons dans le tableau récapitulatif suivant les résultats obtenus :

Nombre de lignes de précipitation trouvés.

	Serum anti Naja naja		Serum anti Echis		Serum anti Bitis		Serum anti Vipera palestinae		Serum anti Vipera aspis	
naja	6	8	3	3	0	2	1	2	0	0
agricollis	3	3	3	3	1	1	(1) 0	1	0	0
naja	4	4	2	2	2	2	1	1	0	0
melanoleuca	2	2	2	2	2	2	1	1	0	0(1)
flava	2	3	2	3	1	1	1	1	0	0
coeruleus	2	3	2	2	0	0	0	1	0	0
aspis viridis	0	0	2	1	2	1	1	1	0	0
scarinata	2	2	7	6	3	3	3	4	3	3
varietans	1	2	2	3	3	3	2	2(1)	1	2
gabonica	2	2	4	4	3	3	2	2	2	2
anasicornus	1	1	3	3(4)	3	3	2	2	1	2
aspis jaune	0	0	4	4	2	2	2	3	10	8
aspis blanc	(1) 0	0	1	1	1	1	2	2	7	6
ammodytes	0	0	3	3	2	2(3)	4	3	4	3
palestinae	0	0	3	4	2	2	4	7	3	2
atrox	0	0(1)	2	2	1	0	0	0(1)	0	0
ps lanceolatus	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
us atrox	0	0(1)	2	2	2	2	1	1	2	1
rodon	0	0	2	2	2	1	1	1	1	0

VIPERIDAE

VIPERIDAE

CROTALIDAE

119, -
TABLEAU N°10

Les immunogrammes précédents nous relevons les correspondances anti-
 ques suivantes :
 nombre de lignes traduisant le nombre d'antigènes communs décelés op-
 aux antigènes venimeux

sérum antivenin de Naja haje :

Naja	Naja	Naja	Naja	Naja	Bungarus
naja	flava	haje	Nigricol	mélanol	coeruleus

sérum antivenin d'Echis carinata :

Echis	Bitis	Bitis	Bitis
carin.	arietans	gabonica	nasicornis

Vipera	Vipera	Vipera
aspis	ammodytes	palestinae

Bothrops	Crotalus	Ancistrodon
atrox	atrox	piscivorus

Naja	Naja	Naja	Naja
naja	haje	flava	Nigricollis

Naja	Dendraspis	Bungarus
Mélanol	viridis	coeruleus

sérum antivenin de Bitis arietans-gabonica ;

Bitis	Bitis	Bitis	Echis
arietans	gabonica	nasicornus	carinata

Vipera	Vipera	Vipera
aspis	ammodytes	palestinae

Naja	Naja	Naja
haje	flava	Nigricollis

Naja	Bungarus	Dendraspis
Mélanol	Coeruleus	viridis

Sérum antivenin de Vipera palestinae :

Vipera	Vipera	Vipera
palestinae	aspis	ammodytes

Bitis a-	Bitis	Bitis	Echis
arietans	gabonica	nasicornis	carinata

Naja	Naja	Naja	Naja	Naja
naja	haje	flava	nigricollis	Malnól.

Bungarus	Dendraspis
coeruleus	viridis

Utilisant le sérum antivenin de Vipera aspis :

Vipera	Vipera	Vipera
aspis	ammodytes	palestinae

Echis	Bitis	Bitis	Bitis
carinatus	arietans	gabonica	nasicornus

Chaque ligne correspond à la communauté qui existe entre un ou plusieurs antigènes continus dans les venins

Reportement d'une même venin vis-à-vis de plusieurs sérums antiveni-
aux.

Par une autre série de réactions immunologiques, dans laquelle aucun des venins (19) étudiés est opposé aux 5 sérums précédents nous avons confirmé les communautés antigéniques entre les venins étudiés.

TABLEAU N° II

Nombre des facteurs antigéniques communs

	: serum : : anti : : Naja naja :	: serum : : anti : : Echis :	: serum : : anti : : Bitis :	: serum : : anti : : Vip. Pales :	: serum : : anti : : Vip. aspis :
a naja	:	:	:	:	:
a nigricollis	:	:	:	:	:
a mélanoleuca	:	:	:	:	:
is carinata	:	:	:	:	:
is arietans	:	:	:	:	:
is gabonica	:	:	:	:	:
is nasicoornis	:	:	:	:	:
era aspis	:	:	:	:	:
era palestinae	:	:	:	:	:
era ammodytes	:	:	:	:	:
cistrodon piscivorus	:	:	:	:	:

Certaines communautés sont mises en évidence par l'une des techniques et non par l'autre. Nous pensons pour expliquer ces résultats en apparence désordonnés que l'absence de précipitation dans une série d'expériences alors qu'on observe une précipitation dans l'autre série est la conséquence d'un mauvais

choix du rapport antigène
anticorps.

Ces résultats mettent en relief :

1° Une différence de constitution caractérisant les venins d'Elapidae et de Viperidae, avec un pont intermédiaire constitué par les venins d'Echis et de Bitis. Le venin de Dendraspis viti-dis n'a pas de lien de parenté immunologique avec celui de Naja naja, mais il n'en a pas non plus avec le venin de Vipera aspis.

2° Qu'il existe une communauté antigénique plus ou moins étroite entre les venins des divers Elapidae d'une part et les venins de Viperidae ; les venins d'Echis et de Bitis possèdent des antigènes communs avec tous les venins que nous avons étudiés. Le venin de Vipera xanthina palestinae est encore en rapport par de nombreux points avec la famille des Elapidae ; quant à celui de Vipera aspis, seuls les venins de Viperidae ont quelques affinités avec lui, à l'exception peut-être du venin de Naja melanoleuca.

3° Une communauté antigénique entre les venins de serpents appartenant à des espèces différentes ; celle-ci débordant largement le cadre zoologique d'une famille ophidienne.

C Contrôle de la pureté des fractions séparées par électrophorèse sur gélose et leur parenté avec d'autres venins:

Seules parmi les substances isolées par électrophorèse sur gélose, les neurotoxines des venins de Naja naja et de Naja nigricollis ont été obtenues à l'état pur, ceci est confirmé par la réaction de diffusion en milieu gélifié d'Ouchterlony, dans laquelle chacune des ces toxines ne donne qu'une seule ligne de précipitation avec le sérum antivenin correspon-

dant. Opposées à des sérums antivenimeux hétérologues, ces deux neurotoxines ont donné les réactions suivantes :

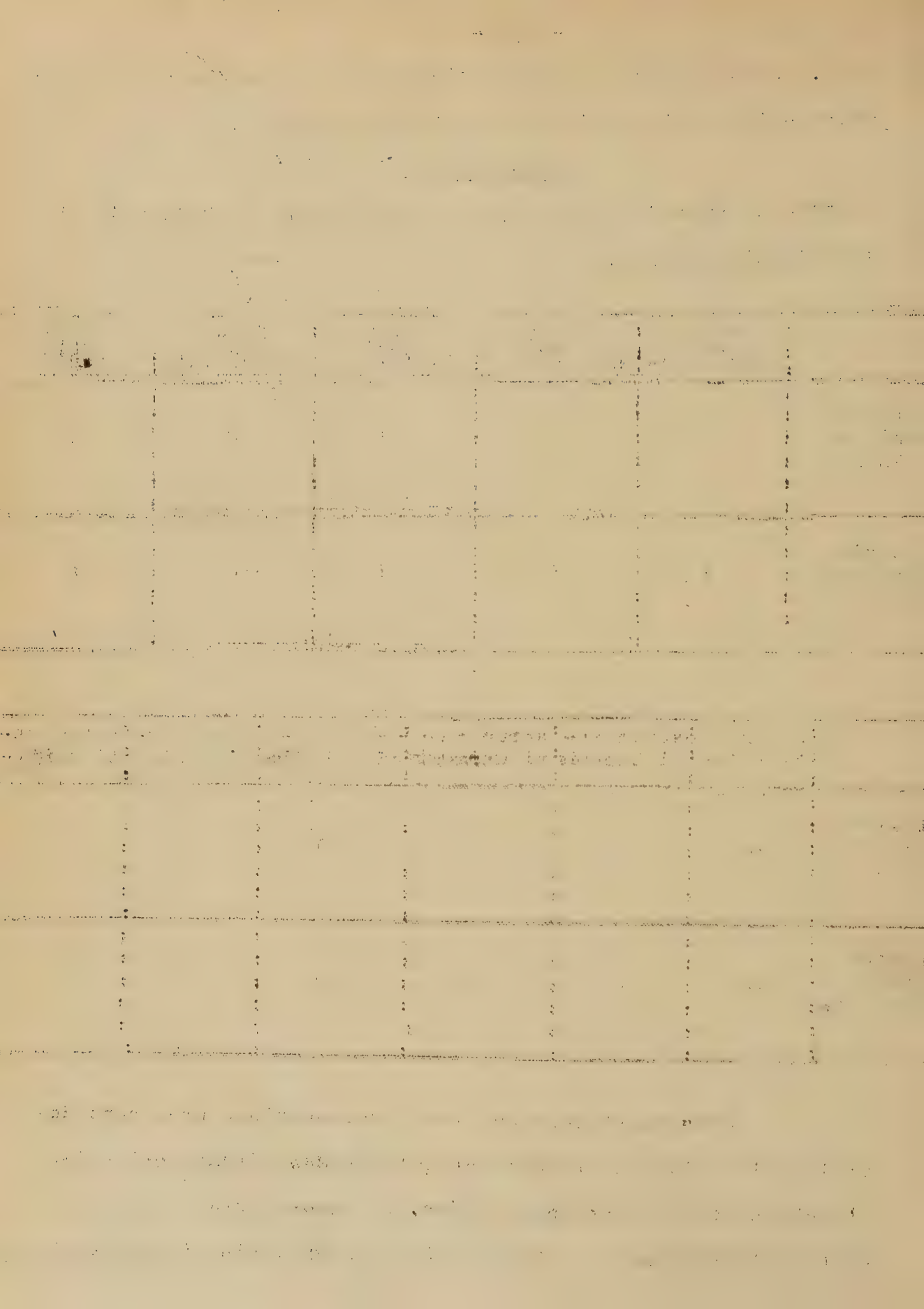
TABLEAU N° 12

Contrôle de pureté des neurotoxines des venins de Naja naja et de Naja nigricollis.

	serum anti Naja naja	serum anti Naja haje	serum anti N.nigricol	serum anti Dendraspis	serum anti Eobis
urotoxine				x	
venin de JA NAJA	I	I	I	O	I
urotoxine					
venin de Nigricollis	I	I	I	O	I

	serum anti Bitis	serum anti Lapemis	serum anti Cerastes	serum anti palestine	serum anti aspis	serum anti ancistrodon
otoxine enin de naja	0	0	0	0	0	0
otoxine enin de gricollis	0	0	0	0	0	0

Nous constatons que les 2 neurotoxines provenant des venins d'Elapidae ne réagissent qu'avec des sérums antivenins d'espèces étroitement apparentées. Ces neurotoxines cependant sont antigéniquement semblables à celle du venin d'Echis carinata.



Au contraire il n'y a pas de réactions croisées entre les sérums antivenin de *Dendraspis viridis* et les venins de Naja d'une part et entre le sérum antivenin de *Lapemis* qui est un *Hydrophiidae*, famille très voisine de celle des *Elapidae* et les mêmes venins de Naja d'autre part. De plus les lignes de précipitation des 2 neurotoxines sont concordantes, ce qui laisse supposer que leurs natures sont identiques, sinon très voisines.

D Immuno-électrophorèse :

Nous avons utilisé la technique décrite par GRABAR et WILLIAMS. Les électrophorèses des cinq venins étudiés ont été faites en milieu gélifié à 1,5 % et tamponné à pH 8,2 par une solution de véronal sodique - ClH de $\mu=0,05$ pendant 4 heures avec un courant de 200 mA sous une tension de 75-80 V et les venins sont en solution dans le tampon à une concentration de 1 mg/ml. A chacun de ces venins nous avons opposé différents immuns-sérums spécifiques et hétérologues.

Nous résumons dans le tableau ci-dessous nos résultats :

TABLEAU N° 13

Nombre de facteurs antigéniques communs

VENINS													
	sérum	anti Naja naja	sérum	anti Naja nigricollis.	sérum anti	Dendraspis	sérum anti	Lapemis	sérum anti	Echis	sérum anti	Bitis	Sérum anti Cerastes
ja	12	8	2	2	7	2	4	(1)	(0)	4			
nigricollis	7	14	-	-	10	-	-	(1)	(1)	-			
	7	12	-	-	18	-	9	7	5	-			
Palestinae	(1)	(3)	-	-	7	-	-	10	15	-			
aspis	(2)	(2)	-	-	8	-	-	16	9	-			

Nous constatons tout d'abord que le nombre des lignes de précipitation donné par cette technique est très nettement supérieur aux nombres que nous avons obtenus avec les méthodes d'LOUDIN et d'OUCHTERLONY. Malgré cette différence nous retrouvons les mêmes communautés antigéniques que précédemment, c'est-à-dire qu'il y a une parenté d'une part entre les venins de Naja naja, de Naja nigricollis, d'Echis et d'autre part entre les venins d'Echis, de Vipera xanthina palestinae et de Vipera aspis ; le venin d'Echis étant intermédiaire entre les deux groupes. Les lignes de précipitation de ces venins avec leur anti-sérum respectif se répartissent comme suit : .../

TABLEAU N° 14

Répartition des antigènes par électrophorèse à pH 6,8

VENINS	SERUMS	Cathode	Anode
de Naja naja	Serum antivenin de N.naja	8	4
de Naja nigricollis	Serum antivenin de N.nigri.	8	6
d'Echis	Serum antivenin d'Echis	10	8
de Vipera palestinae	Serum antivenin de V.pales.	7	8
de Vipera aspis	Serum antivenin de V.aspis	6	10

Ceci vient à l'appui de ce qui a été dit précédemment que les constituants des venins d'Elapidae émigrent sous les effets d'un champ électrique uniforme principalement vers la cathode, alors que ceux des venins de Viperidae se déplacent à la fois vers l'anode et vers la cathode.

E Epreuves de neutralisation d'après la technique d'IPSEN (117) :

Par ces épreuves nous avons recherché non seulement quel était le pouvoir neutralisant d'un sérum vis-à-vis du venin contre lequel il a été préparé, mais encore vis-à-vis des venins et des fractions neurotoxiques séparées par électrophorèse.

Nous avons utilisé la méthode graphique préconisée par J. IPSEN en 1938 pour le titrage des sérums antivenimeux, dans laquelle les doses de venin ou de toxine exprimées ici en dose minimum mortelle sont portées en abscisse et le nombre de ml de sérum en ordonnée.

.../

TABLEAU N° 15

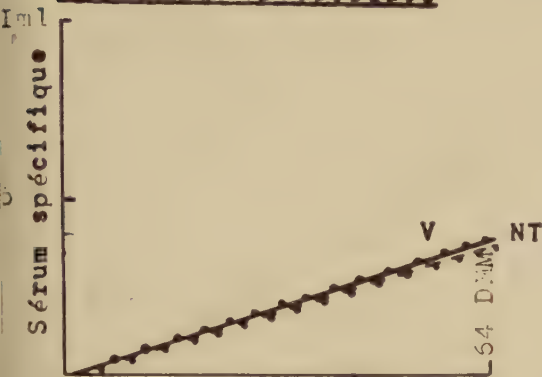
Nombres de DMM neutralisées par 1 ml de sérum :

	D.M.M. <i>N. c.</i>	sérum anti N.Naja	sérum anti N.nigricol	sérum anti Echis car	sérum anti Vip.Pal.	sérum anti Vip.aspis
Naja	9	160	40	18	X	X
kine		165	65	19	X	X
Nigricollis	15	38	90	40	X	X
kine		100	90	55	X	X
Carinata	20	9	12	60	X	X
kine		60	80	50	X	X
Palestinae	10	X	4	10	90	X
kine		X	13	20	8	X
Vipera	25	X	X	8	16	43
kine		X	X	8	15	40

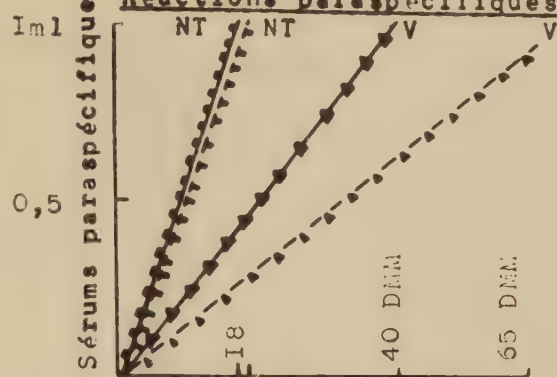
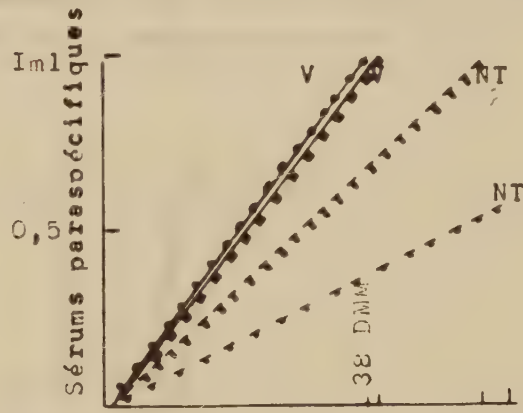
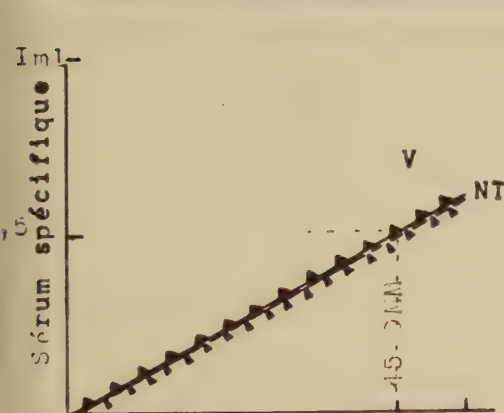
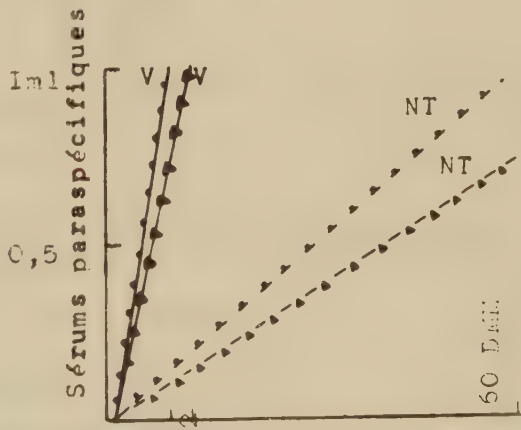
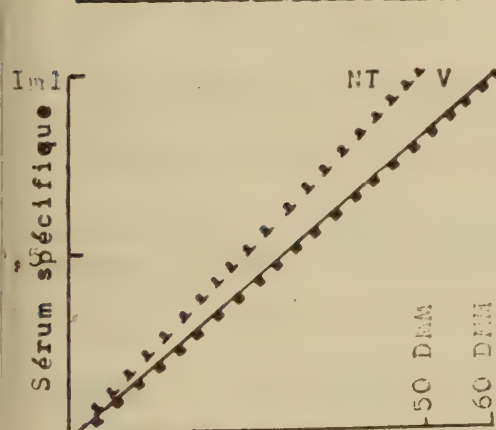
Les neurotoxines des venins de Naja naja et de Naja nigricollis sont donc neutralisées aux mêmes titres par leurs sérums respectifs que les venins d'où elles sont extraites, il en va de même pour la toxine et le venin de Vipera aspis. Par contre les neurotoxines des venins d'Echis carinata et de Vipera palestinae sont sensiblement moins bien neutralisées que leurs

Epreuves de Neutralisation d'après la méthode d'Ipsen

Réactions spécifiques

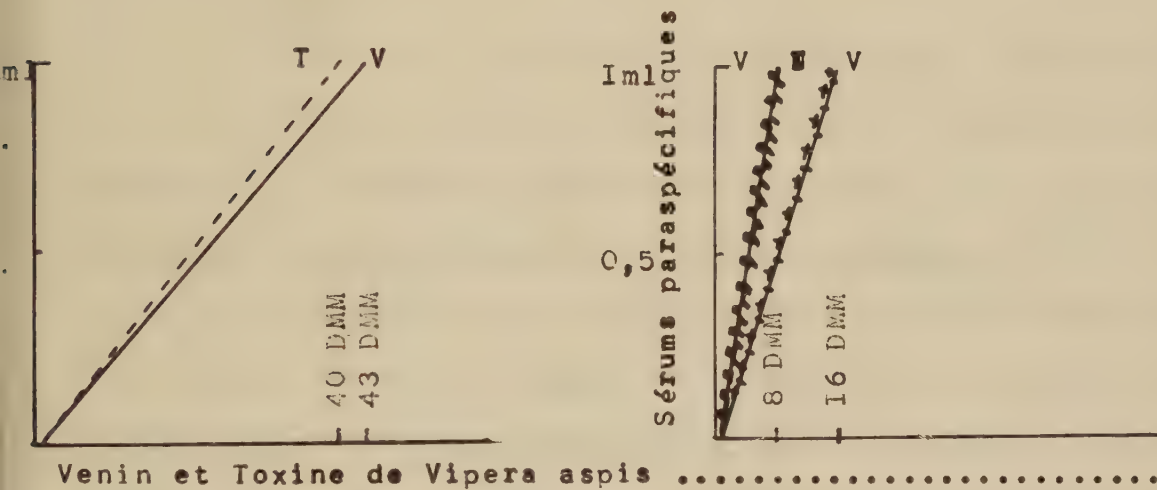
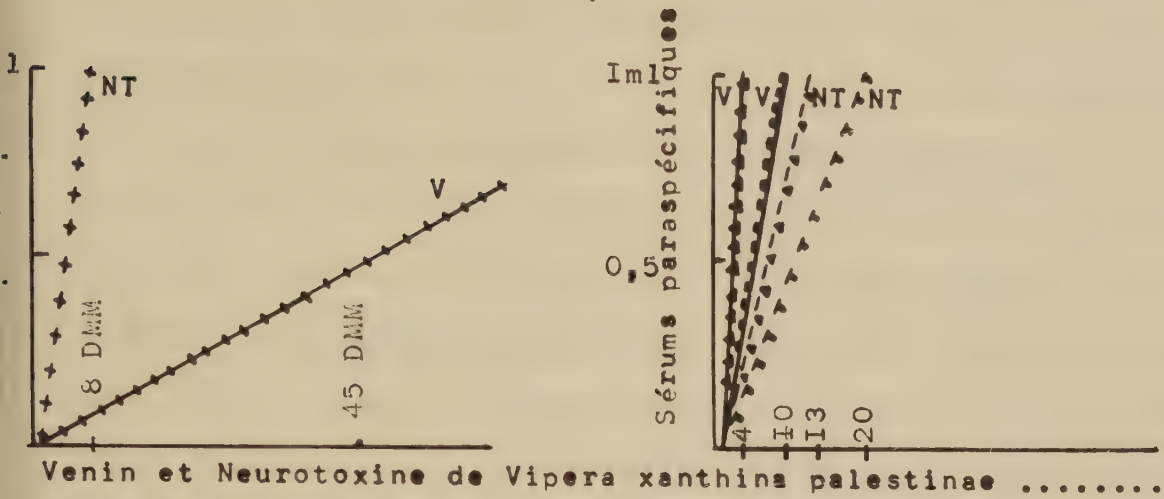


Réactions paraspécifiques

Venin et Neurotoxine de *Naja naja*Venin et Neurotoxine de *Naja nigricollis*Venin et Neurotoxine d'*Echis carinata* Sérum anti-venin de *Naja naja*Sérum anti-venin de *Naja nigricollis*Sérum anti-venin d'*Echis carinata*

Epreuves de Neutralisation d'après la méthode d'Ipsen

(suite)



+++++ Sérum anti-venin de *Vipera xanthina palestinae*

----- Sérum anti-venin de *Vipera aspis*

--- Sérum anti-venin de *Neja nigricollis*

--- Sérum anti-venin d'*Echis carinata*

venins d'origines. Ceci prouve que pour le venin de Naja naja la toxicité totale est le fait de sa neurotoxine et pour le venin de Vipera aspis celui de sa toxine. Alors que les neurotoxines isolées des venins d'Echis carinata et de Vipera palestinae ne constituent qu'une partie de la toxicité totale, démontrant ainsi la présence dans ces venins d'un ou plusieurs facteurs toxiques. Le cas du venin de Naja nigricollis paraît aberrant, car sa neurotoxine est neutralisée de la même façon que le venin brut, laissant ainsi supposer que la neurotoxine est le seul facteur létal du venin or nous avons vu précédemment (p.113) que le venin possède une autre toxine.

Quant aux réactions spécifiques, nous observons une fois encore et de façon plus claire qu'avec les autres épreuves immunologiques la parenté antigénique qui existe entre les venins de Naja naja, Naja nigricollis et d'Echis carinata. Nous relevons en effet à la vue de ces résultats que les effets nocifs de la neurotoxine du venin d'Echis sont mieux neutralisés par les sérums de Naja naja et de Naja nigricollis qu'avec le sérum antivenin d'Echis. Ce même phénomène se reproduit pour la neurotoxine du venin de Vipera palestinae et les sérums antivenins de Naja nigricollis et d'Echis carinata.

De l'ensemble de ces réactions immunologiques, il ressort qu'il existe réellement une communauté antigénique "de groupe" entre certains venins appartenant à des espèces et même à des familles ophidiennes différentes. Ceci vient confirmer l'hypothèse émise en 1894 par CALMETTE selon laquelle des serpents d'espèces éloignées élaborent des venins contenant des toxines de même type, faisant supposer l'existence d'une spécificité

de " groupe" et non "d'espèce".

Le cas des venins de Bitis et surtout celui d'Echis carinata revêt un intérêt particulier du fait de leur position intermédiaire entre les venins de Viperidae et ceux d'Elapidae. Cette considération prouve qu'une classification zoologique, uniquement fondée sur les caractères morphologiques est trop absolue dans sa discrimination ; alors que les réactions immunologiques mettent en évidence, grâce à leur grande sensibilité, des parentés antigéniques entre les constituants de certains venins.

Ces faits sont d'une grande importance non seulement théorique mais également thérapeutique. Car ils démontrent les avantages que l'on peut tirer de l'obtention d'un sérum multivalent contre plusieurs venins du même groupe, dont le pouvoir neutralisant vis-à-vis de certains facteurs nocifs se trouve ainsi considérablement augmenté. D'autre part cette communauté antigénique autorise dans une certaine mesure lorsque le patient ne dispose pas de sérum spécifique, l'emploi d'un sérum doué de propriétés anti-toxiques paraspécifiques.

--x--x--x--x--x--x--x--

C O N C L U S I O N S

Les venins de serpents sont des substances protéiniques toxiques dont la nature est très complexe. Dans ce travail nous avons rappelé, tout d'abord, les symptômes cliniques caractéristiques provoqués par les venins d'Elapidae et de Viperidae dont nous avons fait l'étude, puis leurs propriétés physico-chimiques. De celles-ci, dérivent de très nombreuses méthodes de fractionnement et de purification que nous décrivons et qui nous ont permis d'isoler des facteurs toxiques et enzymatiques dont nous dressons l'inventaire. Enfin sont exposés les résultats de nos expériences :

1° Le fractionnement des venins de Naja naja Naja nigricollis, Echis carinata, Vipera xanthina palestinae et Vipera aspis par électrophorèse sur gel d'Agar agar et l'étude des propriétés des fractions recueillies.

2° L'analyse immunologique de 19 venins provenant de serpents appartenant aux familles des Elapidae et des Viperidae par les réactions d'LOUDIN et d'OUCHTERLONY et par Immunoélectrophorèse. Ces venins ont été opposés à leurs anti-sérums spécifiques et à des immuns-sérums hétérologues. Ces réactions ont mis en évidence une communauté antigénique entre les venins d'espèces et de familles différentes.

3° L'épreuve de neutralisation, d'après la technique d'Ipsen, a confirmé l'existence de telles communautés antigéniques.

.../

En conclusion, certains venins possèdent entre eux des facteurs communs, dont la nature chimique est probablement très voisine. Dans cet ordre de fait nous avons signalé le cas particulièrement intéressant du venin d'*Echis carinata* qui est antigéniquement apparenté par sa neurotoxine à celles des venins de *Naja naja* et de *Naja nigricollis* d'une part et par un second facteur toxique à la toxine du venin de *Vipera aspis* d'autre part, constituant de ce fait "un venin intermédiaire" entre les venins d'Elapidae et ceux de Viperidae.

De telles communautés antigéniques seront utilement mises à profit pour choisir les venins doués des propriétés antigéniques les mieux adaptées à la préparation des sérums antivenimeux .

B I B L I O G R A P H I E

I. ACTON et KNOWLESS

Practice of Med. in the Tropics 1921 - I - 738
(Archibald et Byam)

2. BALOZET L.

"Séparation par électrophorèse de diverses propriétés du venin de
de Vipera lebetina".
Arch. Inst. Pasteur - Alger - 1957 - 6 - 180-189

3. BALOZET L.

"Etude expérimentale in vitro de l'action des venins sur la
morphologie des hématies".
C.R. Acad. Sci. 1961 - 252 - 4055-4057

4. BARRIO A.M.

"Estudio electrophoretico del veneno de serpiente de Cascabel".
Rev. Inst. Bact. Malbran 1954 - 16 - 215-218

5. BARRIO A.H.

"Estudio electroforetico del veneno de serpiente de Cascabel".
Cienc. Invest. 1954 - 10 - 368-370

6. BENDER & HOBEIN

7. BERGENHEM

Acta path. microbiol. scand. 1938

8. BERGMANN M. & FRUTON J.S.

Adv. in Enzymol. 1941 - I - 63

9. BERGMANN M. & FRUTON J.S.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 1944 - 45 - 409

10. BJORK W.

"Partial purification of phosphodiesterase, 5-nucleotidase,
lecithinase and acetylcholinesterase from Ringals-Cobra venom".
Bioch. Biophys. Acta 1961 - 49 - 195-204

11. BJORK W. & PORATH J.

"Fractionation of snake venom by the gel-filtration method".
Acta Chem. Scand. 1959 - 13 - 1256-1259

12. BJORK W. & BOMAN H.G.

"Fractionation of venom from Ringals-Cobra".
Biochim. Biophys. Acta 1959 - 34 - 503-514

13. BLANCHARD M., GREEN D.E., NOCITO V. & RATNER S.

J. Biol. Chem. 1943 - 155 - 421

14. BLYTH A.W.

"On cobric acid".
Analyst - London 1876

15. BOMAN H.G. & KALETTA U.

"Identity of the phosphodiesterase and deoxyribonuclease in Rattle-snake venom".
Nature - 1956 - 178 - 1394-1395

16. BOMAN H.G. & KALETTA U.

"Chromatography of Rattlesnake venom. A separation of three phosphodiesterase".
Biochem. Biophys. Acta 1957 - 24 - 619-631

17. BOMAN H.G.

"On the specificity of the snake venom phosphodiesterase".
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1959 - 81 - 800-803

18. BONAPARTE L.

"Analyse du venin de Vipère et découverte de la Vipérine".
Gaz. tosc. delle Sc. Med. fis. 1843 - 169

19. BOQUET A.

"Sur l'adsorption du venin de Cobra et de la toxine diphtérique par le charbon".
C.R. Acad. Sci. 1928 - 187 - 959

20. BOQUET P.

"L'envenimation" extrait du livre "Venins de serpents et antivenins".
Coll. Inst. Pasteur - Edit. Flammarion 1948 - pp. 33-39

21. BOQUET P.

"Constitution chimique des venins" extrait du livre "Venins de serpents et antivenins".
Coll. Inst. Pasteur - Edit. Flammarion 1948 - p. 92

22. BOQUET P., IZAARD Y. & DETRAIT J.

"Recherche sur le facteur de diffusion des venins de serpents".
C.R. Soc. Biol. 1958 - 152 - 1363-1365

23. BOQUET P., DETRAIT J. & IZAARD Y.

"Application des méthodes immunochimiques de précipitation dans un gel, à l'étude des réactions entre les venins de serpents et les anticorps des sérums antivenimeux".
Congrès intern. Microbiol. Stockholm 1958

24. BOVET-NITTI F.

"Sur la nature de l'estérase contenue dans le venin de Cobra".
Experientia (Bâle) 1947 - 3 - 283-286

25. BROWN & TODD

J. Amer. Chem. Soc. 1951 - 2040

26. BRUNETON T.L. & FAYRE J.

"On the nature and physiological action of the poison of Naja tripidians and other Indian venoms snakes".
Proc. Roy. Soc. London - 1872 - 21 - 358
Proc. Roy. Soc. London - 1873 - 22 - 68

27. BUSSARD A.

"Electrophorèse sur papier du venin de Cobra".
1953 - non publié

28. BUSCARD A. & COTE R.

"Etude de la constitution du venin de COBRA".
C.R. Acad. Sci. 1954 - 239 - 915-917

29. BUSCARD A.

"Exposé d'une technique d'électrophorèse en gélose, ses avantages par rapport à l'électrophorèse sur papier. Application au sérum humain".
C.R. Acad. Sci. 1954

30. BUSCARD A.

"Etude d'une fraction du venin de Cobra (Naja tripudians) ultra-filtrant à travers la cellophane".
6ème Congrès intern. Microbiol. Rome - 1954

31. CALLETTE A.

"Les venins et l'envenimation".
Confér. à la Soc. Internat des Hôpitaux - Paris 1906 - PP;465

32. CALMETTE A.

"Traitement de l'envenimation consécutive aux morsures de serpents".

Traité de thérapeutique appliquée 1915 - pp. 334-337

33. CAREY J. & WRIGHT E.A.

"Isolation of the neurotoxic component of the venom of the sea snake, *Enhydrina schistosa*".

Nature 1960 - 185 - 103-104

34. CARLSON L.A.

Acta Chem. Scand. 1954 - 8 - 510

35. CATAN E.A.

"Adoption du venin de Cobra par le charbon".

C.R. Soc. Biol. (B.Aires) 1921 - 88 - 168-169

36. CATAN E.A.

"Adoption des venins de Lachesis par le charbon. Constitution complexe de l'hépolysine".

C.R. Soc. Biol. (B.Aires) 1921 - 88 - 170

37. CHAIN E.

Quart. J. exptl. Physiol. 1937 - 26 - 300

38. CHATTERJEE A.K.

"Studies on snake venom. I. The isolation of an inhibitor of the cytochrome-cytochrome-oxidase system from Cobra venom and study of the effects of pH, temperature and ultra-violet rays on its stability".

Indian J. med. Res. 1949 - 37 - 240-248

39. CHAUDHURY D.K.

"Cholinesterase".

Ann. Biochem. exp. Med. 1944 - 4 - 77-86

40. CHEN C.J.

"Studies on the snake venom enzyme. II. Electrophoresis studies of formosan Habu (*Trimeresurus macroscymatus*).

Venom and the relation of toxicity with enzyme activities
1949 (Université Yamaguchi)

41. CHEN C.J.

"Studies on the snake venom enzyme. III. Electrophoresis studies of Green Habu (*Trimeresurus gramineus*) venom and the relation of toxicity with enzyme activities".
Universit6 Yamaguchi 1949 - 4 - 575-582

42. CHOPRA R.M., CHOPHAN J.S. & DE S.S.

"An experimental investigation into the action of the venom of *Echis carinatus*".
Ind. J. Med. Res. 1935 - 23 - 391

43. COHN E.J.

Physiol. Rev. 1925 - 5 - 349

44. COLWICK S.P.

"Separation of proteins by use of adsorbents".
Methods in Enzymology 1955 - I - 90-98

45. COLSDEN, GORDON & MARTIN

Biochem. J. 1944 - 38 - 224

46. COLLEGE H. & TISELIUS A.

Biochem. Z. 1950 - 320 - 273

47. DANCN D., GITTLER S. & ROLEN H.

"Deformation of red cell shape induced by *Vipera palestinae* venom in vivo".
Nature - 1961 - 189 - 320-321

48. DE S.S.

J. indian Chem. Soc. 1945 - 22 - 10

49. DE S.S.

"Studies on haemolysin of Cobra venom. I. Investigations on the isolation of haemolysin from Cobra venom (*Naja naja*)".
Ind. J. Med. Res. 1939 - 27 - 531-536

50. DE S.S.

Science a. Culture 1941 - 6 - 675

51. DE S.S. & GHOSH B.N.

"Studies in adsorption of neurotoxin and haemolysin of Cobra venom (Naja naja) by various adsorbents at different pH with a view to their isolation".

J. Indian Chem. Soc. 1937 - 14 - 748-755

52. DE S.S.

"Physiochemical studies on haemolysin. I. Crystallin haemolysin (lecithinase)".

Ann. Biochem. a. Exp. Med. 1944 - 4 - 45-46

53. DELEZENNE C. & LEDEBT S.

"Action du venin de Cobra sur le sérum de cheval. Ses rapports avec l'hémolyse".

C.R. Acad. Sci. 1911 - 152 - 790-792

C.R. Acad. Sci. 1911 - 152 - 1101-1103

54. DELEZENNE C. & LEDEBT S.

"Formation de substances hémolytiques et toxiques aux dépens du vitellus de l'oeuf".

C.R. Acad. Sci. 1911 - 153 - 161-164

55. DELEZENNE C. & LEDEBT S.

"Les poisons libérés par les venins aux dépens du vitellus de l'oeuf".

C.R. Soc. Biol. 1911 - 71 - 121-124

56. DETRAIT J. & BOQUET P.

"Séparation des constituants du venin de Naja naja par électrophorèse".

C.R. Acad. Sci. 1958 - 246 - 1107-1109

57. DETRAIT J., IZARD Y. & BOQUET P.

"Séparation par électrophorèse des constituants toxiques des venins de Naja naja et de Naja nigricollis".

C.R. Soc. Biol. 1959 - 153 - 1722-1724

58. DETRAIT J., IZARD Y. & BOQUET P.

"Relations antigéniques entre un facteur léthal du venin d'Echis carinata et les neurotoxines des venins de Naja naja et de Naja nigricollis".

C.R. Soc. Biol. 1960 - 154 - 1163

59. DIXON

Biochem. J. 1953 - 54 - 457

60. DOLLY R..

"The separation and properties of the neurotoxin from the venom of the Tiger snake (*Notechis scutatus scutatus*)".
Biochem. J. 1958 - 70 - 535-543

61. DURAN-REYNALS F.

Science 1936 - 13 - 286
Bacteriol. Revs. 1942 - 6 - 117

62. DURRUM L.

"A microelectrophoretic and microionophoretic method".
J. Am. Chem. Soc. 1950 - 72 - 2943

63. EFATI P. & REIF L.

"Clinical and pathological observations on sixty-five cases of viper bite in Israel".
Amer. J. of Trop. Med. & Hyg. 1953 - 2 - 1085-1108

64. ELLIOT R.H.

"A contribution to the study of the action of Indian Cobra poison".
Proc. Roy. Soc. London 1904 - 73 B - 190-193

65. FAHRAUS R.

Physiol. Rev. 1929 - 9 - 241

66. FAHLE P. & RANCE L.H.

"The relation between plasma coagulation time and prothrombin concentration".
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 1947 - 25 - 95-101

67. FAUST E.S.

"Uber das Ophiotoxin aus den Gifte der ostindischen Brillenschlange Cobra di Capelle".
Arch. f. exp. Path. u. Pharmac. 1907 - 56 - 236

68. FAUST E.S.

"Estudio de las condiciones de adsorcion de venenos ofidicos y su application a la inmunizacion equina".
Anal. Soc. Cientif. Argent. 1961 - 171 - 3-29

69. FISCHER F.G. & NEUMANN W.P.

"Die electrophoretische Analyse der Gifte von Naja haje und Naja nigricollis".
Hoppe Seyler's Ztschr. f. Physiol. Chem. 1954 - 297 - 92-99 .

70. FISCHER F.G. & DORNEL H.

"Die Aminosäuren-Zusammensetzung von Crotoxin".
Hoppe Seyler's Ztschr. f. Physiol. Chem. 1954 - 295 - 278

71. FISCHER F.G. & NEUMANN W.P.

"Die electrophoretische Analyse der Gifte von Bitis arietans und Echis carinatus".
Hoppe Seyler's Ztschr. f. Physiol. Chem. 1954 - 297 - 100-103

72. FEXNER S. & NOGUCHI H.

"Plurality of cytolyisin in snake venom".
J. Path. Bact. 1905 - 10 - III-124

73. FOLINI P. & PORATH J.

"Zone electrophoresis in starch columns".
Biochem. & Biophys. Acta 1954 - 13 - 175-182

74. FOLLEY S.J. & GRAY H.D.

Ergeb. Enzymforsch. 1936 - 5 - 159

75. FOML-BECH P. & LI C.H.

J. Biol. Chem. 1954 - 207 - 175

76. FRAENKEL-CONRAT H. & SINGER B.

"Fractionation and composition of Crotoxin".
Arch. Biochem. Biophys. 1956 - 60 - 64-73

77. FRENZ R.

"Une cuve à électrophorèse à usages multiples".
Clin. Chim. Acta 1959 - 4 - 317-321

78. GANGULY S.N. & MALLAMA M.T.

"Daboia venom. Its chemical composition, protein fractions and their physiological actions".
Ind. J. Med. Res. 1936 - 23 - 7-1006

79. GANGULY S.N. & HANNAH M.T.

"Cobra venom. Its chemical composition protein fractions and their physiological actions".
Ind. J. Med. Res. 1936 - 24 - 281-286

80. GANGULY S.N. & HANNAH M.T.

Trop. dis. Bull. 1937 - 34 - 642

81. GAUTIER A.

"Sur le venin de Naja triudians de l'Inde".
Bull. Acad. Med. Paris - 1881 - 10 - 947-958

82. GENNARO J.F. & HARLEY H.M.

"The toxicity of some precipitated of dried Mocassin venom (Ancistrodon piscivorus piscivorus)".
Amer. J. Trop. Med. a. Hyg. 1959 - 8 - 546-551

83. GHOSH B.N., DE S.S. & MUDU P.L.

"Separation of neurotoxin of Cobra venom".
Sc. a. Cult. 1938 - 4 - 133

84. GHOSH B.N. & DE S.S.

"Investigation on the isolation of the neurotoxin and haemolysin of Cobra venom (Naja naja)".
Ind. J. Med. Res. 1938 - 25 - 779-786

85. GHOSH B.N., DE S.S. & CHAUDHURY D.R.

"Separation of the neurotoxin from the crude Cobra venom and study of the action of a number of reducing agents on it".
Ind. J. Med. Res. 1941 - 29 - 367-373

86. GHOSH B.N., DE S.S. & BHATTACHARYA D.P.

"Investigation on the isolation of the active principles from the venoms of Bungarus fasciatus and Vipera russellii".
Ind. J. Med. Res. 1939 - 26 - 753-758

87. GHOSH B.N. & DE S.S.

"Proteins of Rattlesnake venom".
Nature - 1939 - 143 - 380

88. GHOSH B.N. & DE S.S.

Trop. dis. Bull. 1938 - 35 - 430

89. GHOSH B.M., CHATTOPADHYAY A. & SINHA A.C.

"Effect of snake venom on the cytochrome-cytochrome-oxidase system".

J. ind. Chem. Soc. 1948 - 25 - 384

90. GITTER S., KOCHWA S., DE VRIES A. & LEFKOWITZ L.

"In vivo and in vitro activities of electrophoretic fractions of *Vipera palestinae* venom".

20ème Congrès intern. Physiol. Bruxelles - 1956

91. GITTER S., KOCHWA S., DE VRIES A. & LEFKOWITZ L.

"Studies on electrophoretic fractions of *Vipera xanthina palestinae* venom".

Amer. J. Trop. Med. a. Hyg. 1957 - 6 - 180-189

92. GITTER S., LEVI G., KOCHWA S., DE VRIES A., RECHNIE J.

& CASPER J.

"Studies on the venom of *Echis colorata*".

Amer. J. of trop. Med. a. Hyg. 1960 - 9 - 391-399

93. GITTER S., KOCHWA S., DANON D. & DE VRIES A.

"Disk-sphere transformation and inhibition of rouleaux formation and of sedimentation of human red blood cells induced by *Vipera xanthina palestinae* venom".

Arch. int. pharmacod. 1959 - 118 - 350-357

94. GONCALVES J.M. & POLSON A.

"The electrophoretic analysis of snake venoms".

Arch. Biochem. 1947 - 13 - 253-259

95. GONCALVES J.M. & VIANA L.G.

"Estudos sobre venenos de serpentes Brasileira. I. Analise electrophoretica".

Ann. Acad. Brasil. Cienc. 1950 - 22 - 141-150

96. GONCALVES J.M.

"Purification and properties of Crotamine".

Venoms. Amer. Assoc. Adv. Sci. 1956 - 44 - 261-273

97. GONCALVES J.M. & DEUTSCH H.F.

"Ultraconcentrifugal and zone electrophoresis studies of some Crotalidae venoms".

Arch. of Biochem. a. Biophysic. 1956 - 60 - 402-411

98. GORDON A.H., KEIL B., SEBLSTA K., KRESSL O. & SORM F.

Coll. Tr. Chim. Tschecosl. 1950 - 15

"Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques".
Biochem. & Biophys. Acta 1955 - 17 - 67-74

"Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques".
Biochem. & Biophys. Acta 1955 - 17 - 67-74

100. GRASSET E., BUCHBULLER T., SCHWARTZ D.E. & PONGRATZ E.

"Comparative analysis and electrophoretic fractionations of snake venoms with special reference to *Vipera russellii* and *Vipera aspis* venoms".

Venoms. Amer. Assoc. Adv. Sci. 1956 - 44 - 153-169

101. GRASSET E. & SCHWARTZ D.E.

"Fractionnement par électrophorèse sur papier du venin de *Vipera russellii*. Propriétés et dosages des facteurs coagulant et anticoagulant du venin".

Ann. Inst. Pasteur 1955 - 88 - 271-281

102. GREEN A.A. & HUGHES H.L.

"Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents".

Methods in Enzymology 1957 - 1 - 67

103. GUYOT P. & BOQUIT P.

"Envenimation expérimentale du lapin par injection intracérébrale d'un venin d'Elapidé".

C.R. Acad. Sci. 1960 - 251 - 1822-1824

104. HABERMANN E. & FEURMAN H.

"Beiträge zur Charakterisierung der Wirksamen Komponenten von Schlangengiften".

Arch. exp. Path. Pharmacol. 1954 - 223 - 368

105. HABERMANN E.

"Über Zusammenhänge zwischen esterolytischen und pharmakologischen Wirkung von Jararacagift, Kallikrein und Thrombin".

Arch. exp. Path. u. Pharmacol. 1959 - 236 - 499-502

106. HAHN L.

Biochem. Z. 1943 - 315 - 83

Arch. Kemi. Mineral Geol. 1946 - A 22 - N°1 - 1-20

Arch. Kemi. Mineral Geol. 1946 - A 22 - N°2 - 1-13

107. HANSEN A.

"Essai de purification de divers venins de serpents".

C.R. Soc. Biol. 1931 - 106 - 322-324

108. HENRIQUES O.B., LAVRAS A.A.S. & FICHMAN H.

Ciencia e cultura 1956 - 8 - 240

109. HENRIQUES O.B., LAYERS A.A.C., FICHMAN H. & ANDELBAUM F.

"The proteolytic activity of the venom of *Bothrops jararaca*".
Biochem. J. 1958 - 66 - 547-605

110. HENRIQUES O.B., FICHMAN H., HENRIQUES S.B. & FERRAZ

DE OLIVEIRA

"Fractionation of the venom of *Bothrops jararaca* by ammonium sulphate. Purification of some of the fractions obtained".
Mem. Inst. Butantan - 1959 - 22 - 181

111. HENRIQUES O.B., FICHMAN H. & HENRIQUES S.B.

"Partial purification and some properties of the blood-clotting factor from the venom of *Bothrops jararaca*".
Biochem. J. 1960 - 75 - 551-556

112. HENRIQUES O.B., FICHMAN H. & BERALDO H.T.

"Bradykinin releasing factor from *Bothrops jararaca* venom".
Nature. 1960 - 187 - 414-415

113. HOLTZ P. & RAUDCHAT H.H.

"Über Beziehungen zwischen proteolytischer Aktivität und blutcoagulierender sowie Bradykininfreisetzender Wirkung von Schlangengiften".
Arch. exp. Path. u. Pharmac. 1956 - 229 - 113-122

114. HOME P.E.

J. Biol. Chem. 1921 - 49 - 93-107 & 109-113

115. HOME P.E.

J. Biol. Chem. 1923 - 57 - 241

116. HURST R.C. & BUTLER GC.

"The chromatographic separation of phosphatases in snake venoms".
J. Biol. Chem. 1951 - 193 - 91-96

117. IPSEN J.

"Rapport préliminaire sur la possibilité de standardiser les sérums antivenimeux".
Bull. Org. Hyg. S.D.N. 1938 - 7 - 848

I27. KONDO H., KONDO S., IKEZAWA N., MURATA R. & OHSAKA A.

"Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom".
Jap. J. Med. Sci. Biol. 1960 - 13 - 43-51

I28. KUHN & LEDERER

Naturwissensch. 1931 - 19 - 306

I29. KUNKEL H.G. & SLATER R.J.

"Zone electrophoresis in a starch supporting medium".
Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 1952 - 80 - 42-44

I30. KYES P.

"Über die Isolierung von Schlangengift-Lecithinen".
Berl. Klin. Woch. 1903 - 40 - 956-959

I31. KYES P. & SACHS H.

"Contribution à la connaissance des substances qui activent le venin de Cobra".

Berl. Klin. Worsch. 1902 - 39 - 886

Berl. Klin. Worsch. 1903 - 40 - 21,57,82,956,982

I32. LEE C.Y., CHANG C.C. & KAMIJO K.

"Cholinesterase inactivating activity of snake venom".
Venoms. Amer. Assoc. Adv. Sci. 1956 - '44 - 197

I33. LEFROU G. & MARTIGNOLLE J.

"Contribution à l'étude des propriétés du venin d'un Vipéridé africain Echis carinatus".

Ann. Inst. Pasteur 1954 - 86 - 446-447

I34. LONGWORTH L.G., CANNAN R.K. & MAC INNES

J. Am. Chem. Soc. 1940 - 62 - 2580

I35. MADINAVEITIA J.

"Diffusing factors".

Biochem. J. 1939 - 33 - 1470-1477

I36. MAENO K., MORIMURA M., MITSUHASHI S., SAWAI Y. & OKONOJI T.

"Further purification and enzymic and biological activities of H.alpha proteinase".

Japan J. Microb. 1959 - 3 - 277-284

I37. MAENO H. & MITSUHASHI S.

"Studies on Habu snake venom . IV. Fractionation of Habu snake venom by chromatography on CM.Cellulose".
J. Biochem. 1961 - 50 - 434-439

I38. MARTIN C.J. & MC SMITH G.

"The venom of Australian Black snake".
Proc. Roy. of N.S. Wales 1892 - 26 - 240

I39. MARTIN C.J.

"Note on a method of separating colloids from cristalloids by filtration".
Proc. Roy. of N.S. Wales 1896 - 30 -

I40. MARTIN & SYNGE

Biochem. J. 1941 - 35 - 1358

I41. MARX W. & PECK S.M.

"Cataphoretic separation of toxic components of Mocassin venom".
Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 1938 - 38 - 84-86

I42. MASTER R.W.P. & RAO S.S.

"Identification of enzymes and toxins in venoms of Indian Cobra and Russell's viper after starch gel electrophoresis".
J. Biol. Chem. 1961 - 236 - 1986-1990

I43. MERCHANTE F.M.

"Composition des venins de serpents et action comparative des globulines et des albumines".
C.R. Soc. Biol. 1936 - 122 - 487

I44. MICHEEL F. & JUNG F.

"Zur Kenntnis der Schlangengift".
Hoppe Seyler's Zschr. f. Physiol. Chem. 1936 - 239 - 217-220

I45. MICHEEL F.

"Mitteilung über Schlangengifte".
Nachr. Ges. Wiss. Göttingen Math. Phys. 1936 - 2 - 217-220

I46. MICHL H.

"Analyse électrophorétique et enzymatique du venin de Bothrops jararaca".
Naturwiss. 1954 - 41 - 403

I47. MICHL H. & KISS G.

"Vergleichende Untersuchungen von Schlangengiften".
Monatshefte für Chemie 1959 - 90 - 604-608

I48. MITCHELL W.

"The venom of serpents".
Med. Times a. Gaz. - London - 1869 - I - 137

I49. MITCHELL S.W. & REICHERT E.T.

"Researches upon the venom of poisonous Serpents".
Lancet 1886 - 26 -

I50. MITCHELL S.W. & REICHERT E.T.

Med. News 1883 - 42 - 469-472

I51. MUIC N. & MENIGA A.

"Phosphatidase a activity of Ammodytes Viper venom".
Arch. Za Kemiju 1955 - 27 - 131-136

I52. NEDJALKOV ST. & NASHKOWA O.

"Electrophoretische und Chromatographische Untersuchungen des Giftes der bulgarischen Kreuzotter (Vipera ammodytes ammodytes)".
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 1961 - 182 - 261-267

I53. NEUMANN W.P. & HABERMANN E.

"Über Crotactin, das Haupttoxin des Giftes der brasilianischen Klapperschlange (Crotalus terrificus terrificus)".
Biochem. Zeitsch. 1955 - 327 - 170-185

I54. NIKKILA E.A., HAAHTI E. & PESOLA R.

Acta Chem. Scand. 1953 - 7 - 1222

I55. NOGUCHI H.

"The photodynamic action of eosin and erythrosin upon snake venom".
J. exp. Med. 1906 - 8 - 252-267

I56. NYGAARD A.P. & SUMMER J.B.

J. Biol. Chem. 1953 - 200 - 723

I57. NYGAARD A.P.

J. Biol. Chem. 1953 - 204 - 655

I58. OHSAKA A.

"Proteolytic activities of Habu snake venom and their separation from lethal toxicity".

Jap. J. Med. Sci. Biol. 1960 - 13 - 33-41

I59. OHSAKA A., IKEZAWA H., KONDO H. & KONDO S.

"Two hemorrhagic principles derived from Habu snake venom and their difference in zone electrophoretic mobility".

Jap. J. Med. Sci. Biol. 1960 - 13 - 73-76

I60. OHSAKA A., IKEZAWA H., KONDO H., KONDO S. & UCHIDA N.

"Haemorrhagic activities of Habu snake venom, and their relation to lethal toxicity, proteolytic activities and other pathological activities".

Brit. J. exp. Pathol. 1960 - 41 - 478-486

I61. OHSAKA A.

"Fractionation of Habu snake venom by chromatography on CM-cellulose with special reference to biological activities".

Jap. J. Med. Sci. Biol. 1960 - 13 - 199-205

I62. OUCHTERLONY O.

Acta Path. Microbiol. Scand. 1948 - 25 - 186

I63. OUDIN J.

Ann. Inst. Pasteur 1946 - 75 - 30 & 109

Ann. Inst. Pasteur 1955 - 89 - 531

I64. PEDLER A.

"On Cobra poison".

Proc. of Roy. Soc. London - 1878 - 27 - 17

I65. PETERSON E.A. & SOBER H.A.

J. Amer. Chem. Soc. 1955 - 78 - 751

I67. PHISALIX M.

"Animaux venimeux et venins".

Edit. Masson 1922 - 2 - 336-469

I66. PFLEIDERER G. & SUMYK G.

"Investigation of snake venom enzymes. I. Separation of Rattlesnake venom proteinase by cellulose ion-exchange chromatography".

Biochem. Biophys. Acta 1961 - 51 - 482-493

I68. PIANTANIDA M. & MUIC N.

"The antigenic composition of Ammodytes Viper venom".
J. of Immunol. 1954 - 73 - II5-II9

I69. POLSON A.

"An electrophoresis apparatus for the rapid routine analysis of sera and other protein solutions".
Onderstepoort J. of Veterin. Sci. Anim. Indust. 1945 - 20 -
I59

I70. POLSON A., JOUBERT F.J. & HAIG D.A.

"An electrophoretic examination of Cobra venom".
Biochem. J. 1946 - 40 - 265-269

I71. PRIVAT DE GARILHE M. & LASKOWSKI M.

"Studies of the phosphodiesterase from Rattlesnake venom".
Biochem. Biophys. Acta 1955 - 18 - 370-378

I72. RADOMSKI J.L. & DEICHMANN W.B.

"The relationship of certain enzymes in Cobra and Rattlesnake venoms to the mechanism of action of these venoms".
Biochem. J. 1958 - 70 - 293-297

I73. RAUDONAT H.W.

"Über den dialysablen Anteil des Kobragiftes".
Naturwissensch. 1955 - 42 - 648

I74. RAUDONAT H.W. & HOLLER B.

"Über die herzwirksame Komponente des Kobragiftes ('Cardio-toxin', s)".
Arch. exp. Path. u. Pharmak. 1958 - 233 - 431-437

I75. RAUDONAT H.W.

"Papierchromatographische Auftrennung eines Schlangengiftes (Vipera ammodytes)".
Naturwiss. 1955 - 42 - 558-559

I76. RAUDONAT H.W.

"Papierchromatographische Abtrennung eines Proteasen-Hemms-
toffes aus Schlangengiften".
Naturwiss. 1955 - 42 - 559-560

I77. RAUDONAT H.W.

"Chemistry and pharmacology of snake venom".
non publié 1958

I78. CIASCA-RENDINA & BOVET-NITTI F.

"Analyse chromatographique de l'action lécithinasique du venin de Cobra et d'abeille".

Chromatography - 1960 - 3 - III-120

I79. ROCHA E SILVA M. & BERALDO W.T.

Ciencia e Cultura 1949 - I - 32

I80. ROCHE J. & COURTOIS J.

Exposés ann. biochem. med. 1944 - 4 - 219

I81. ROSENFELD S. & RUBINSTEIN J.

"Separation of the coagulant from the toxic principles of the venom of australian Tiger snake (*Notechis scutatus*) with remarks on the mode of action of the coagulant".

J. lab. a. Clin. med. 1941 - 27 - 45-47

I82. ROSENFELD G., HAMPE O.G. & KELEN E.M.A.

"Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms; determination of coagulant and fibrinolytic index of different species".

Mem. Inst. Butantan 1959 - 29 - I43-I63

I83. ROY A.C. & CHOPRA R.N.

"Some biochemical characteristics of snake venom".

Ind. J. Med. Res. 1938 - 26 - 241-248

I84. SARKAR N.K.

"Isolation of Cardiotoxin from Cobra venom (*Naja tripudians*)".

J. Ind. Chem. Soc. 1947 - 24 - 227-232

I85. SARKAR N.K.

"Determination of molecular weight of Cardiotoxin by diffusion method".

J. Ind. Chem. Soc. 1947 - 24 - 61-64

I86. SCHALES O.

"Empfindliche Methoden zum Nachweis von Wasserstoffperoxyd und seiner Entstehung bei einigen Dehydrierungs-Vorgängen".

Ber. deuts. Chem. Gesellsch. 1938 - 71 - 447-460

187. SIEMENS H.H.

"Untersuchungen über Hitzebeständigkeit von Schlangengift".
Tag. d. deut. Verein f. Microbiol. in Centralbl. f; Bakt.
1937 - 140 - 217

188. SINGER T.P. & KEARNEY E.B.

"The L-aminoacid oxidase of snake venom. II. Isolation and
characterization of homogeneous l-amino acid oxidase".
Arch. Biochem. 1950 - 29 - 190-209

189. SINSHEIMER R.S. & KOERNER J.F.

"A purification of venom phosphodiesterase".
J. of Biol. Chem. 1952 - 198 - 293-296

190. SLOTTA K.H. & FRAENKEL-CONRAT H.L.

"Reinigung und Krystallisation des Klapper-Schlangengiftes".
Ber. dtsh. Chem. Ges. 1938 - 71 - 1076-1081

191. SLOTTA K.H. & FRAENKEL-CONRAT H.L.

"Estudos quimicos sobre as venenos Ofidicos. IV. Purificação
e Cristalização de veneno da Cobra Cascabel".
Mem. Inst. Butantan 1938-39 - 12 - 505-512

192. SLOTTA K.H.

"Chemistry and biochemistry of snake venoms".
Fortschr. Chem. Org. Nat. 1955 - 12 - 406-465

193. SMITHIES O.

"Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the
sérum proteins of normal human adults".
Biochem. J. 1955 - 61 - 629-641

194. STEDMAN E., STEDMAN E. & EASSON L.

Biochem. J. 1932 - 26 - 2056

195. SWAROOP S. & GRAB B.

"La mortalité par morsur de serpents dans le monde".
Bull. Org. mond. Santé 1954 - 10 - 35

196. TAGUET C., ROUSSEAU E. & DUMATRAS R.

C.R. Soc. Biol. 1933 - 113 - 9

197. TETSCH C. & WOLFF K.

"Analogies entre le venin d'abeilles et le venin de Crotale (Crotalus terrificus)".
Biochem. Z. 1936 - 288 - 26-36

198. THEODOR O.

"On poisonous snakes and snake-bite in Israel".
The Israel scientific press - Jérusalem 1955

199. TISELIUS A.

"A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures".
Trans. Farad. Soc. 1937 - 33 - 524

200. TODD C.

"On the electrical behaviour of the bacteriophage".
Brit. exp. Path. 1927 - 8 - 369-376

201. TURNER J.C.

"Absence of lecithin from the stroma of the red cells of certain animals (ruminants), and its relation to venom hemolysis".
J. exp. Med. 1957 - 105 - 189-193

202. VOLKIN & COHN

J. Biol. Chem. 1953 - 205 - 767

203. WADSWORTH A.

"Standards methods".
Baillièrre, Tindall et Cox - London 1927 - p. 387

204. WALL A.J.

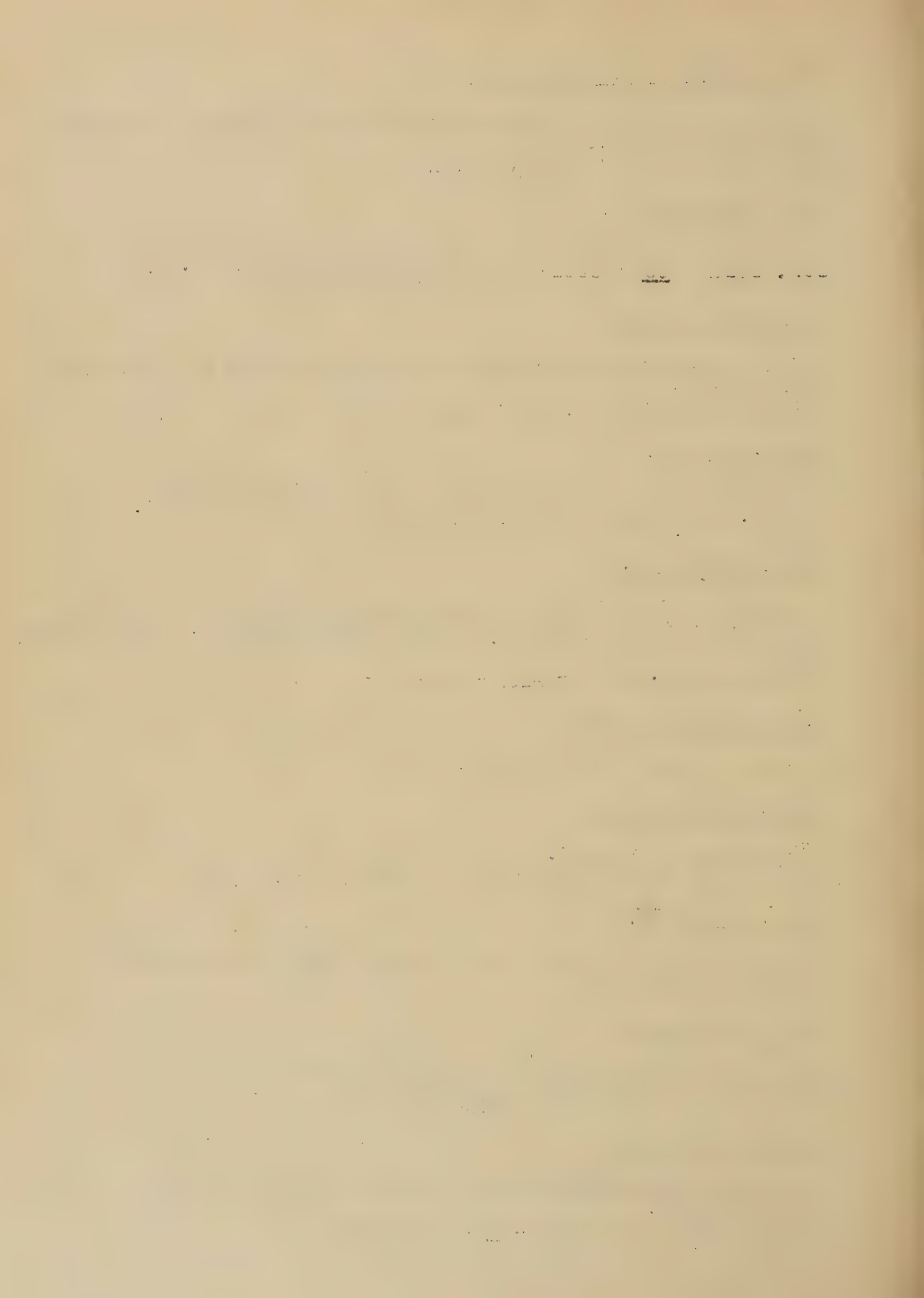
"Indian snake poisons, their nature and their effects".
London 1883 - 171

205. WIEDEMANN

Int. Arch. Allergy appl. Immunology 1954 - 5 - 1
Helv. Chim. Acta 1952 - 35 - 82

206. WIEME R.J.

"An improved technique of agar-gel electrophoresis on microscope slides".
Clin. Chim. Acta 1959 - 4 - 317-321



207. WILLIAMS W.J. & ESNOUF M.P.

"The fractionation of Russell's Viper venom with special reference to the coagulant protein".
Biochem. J. 1961 - 81 - 20 P

208. WILLSTATTER R.

Ber. 1922 - 55 - 3601

209. WOLFENDEN N.

"On the nature and action of the venom of poisonous snakes".
J. of Physiol. 1886 - 7 - 327-364

210. YANG C.C., CHEN C.J. & SU C.C.

"Biochemical studies on the formosan snake venoms. IV. The toxicity of formosan Cobra venom and enzyme activities".
J. Biochem. 1959 - 46 - 1201-1208

211. YANG C.C., CHANG C.C.

"Biochemical studies on the snake venoms. VI. On the ophiol-amino acid oxidase activity of formosan snake venoms".
J. Form. Med. Assoc. 1960 - 59 - 961-971

212. YANG C.C., CHIU W.C. & KAO K.C.

"Biochemical studies on the snake venoms. VII. Isolation of venom cholinesterase by zone electrophoresis".
J. Biochemist. 1960 - 48 - 706-713

213. YANG C.C., KAO K.C. & CHIU W.C.

"Biochemical studies on the snake venoms. VIII. Electrophoretic studies of Banded Krait (Bungarus multicinctus) venom and the relation of toxicity with enzyme activities".
J. Biochemist. 1960 - 48 - 714-722

214. YANG C.C.

"Biochemical studies on the formosan snake venoms. III. Electrophoretic patterns of the formosan Cobra and Agkistrodon acutus venoms".
J. Form. Med. Assoc. 1958 - 57 - 567-573

215. YANG C.C., SU C.C. & CHEN C.J.

"Biochemical studies on the formosan snake venoms. VI. The toxicity of Hyappoda (Agkistrodon acutus) venom and enzyme activities".
J. biochem 1959 - 46 - 1209-1215

216. YANG C.C., IWANAGA S. & KAWACHI S.

"Biochemical studies on the formosan snake venoms. II. Some observations on the column chromatography of Cobra venom".
J. Form. Med. Assoc. 1958 - 57 - 525-533

217. YANG C.C. & TAKEMURA S.

"Biochemical studies on the formosan snake venoms. I. On the mechanism of the action of formosan Cobra venom on nucleic acids".
J. Form. Med. Assoc. 1958 - 57-349-357

218. YANG C.C. & CHANG L.T.

"Studies on the phosphatases activities of formosan snake venoms".
J. Form. Med. Assoc. 1954 - 43 - 609-616

219. ZELLER E.A.

"Enzyme of snake venoms and their biological significance".
Adv. in Enzymol. 1948 - 8 - 459-495

220. ZELLER E.A. & MARITZ A.

Helv. Chim. Acta 1944 - 27 - 1888

221. KAMINSKY M.

"Quelques observations sur la technique de précipitation en milieu gélifié d'Ouchterlony. I. Influence de la recharge en antigène".
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954 - 36 - 279-293

TABLE DES MATIERES

<u>Introduction</u>	Pages I à 4
<u>Première partie</u>	
Données bibliographiques sur les propriétés des venins leur fractionnement et leurs principaux constituants	6 à 104
<u>I. Propriétés générales</u>	<u>6 à 21</u>
A. Constitution des venins	6 à 8
B. Comportement des venins à l'égard des agents physiques et chimiques	8 à 13
C. Action pathogène des venins. Envenimation	13 à 19
D. Utilisation des venins en thérapeutique	19 à 21
<u>II. Fractionnement des venins</u>	<u>22 à 78</u>
A. Historique	22 à 25
B. Techniques de fractionnement	
1°. Séparation par Précipitations	27 à 40
2°. Séparation par Electrophorèse	40 à 54
3°. Séparation par Dialyse et Ultracentrifugation	55
4°. Séparation par les Adsorbants	55 à 64
5°. Séparation par Chromatographie	64 à 77
<u>III. Etudes des principaux principes actifs</u>	<u>79 à 104</u>
1°. Toxines	79 à 83
2°. Hémolysines	83 à 85
3°. Cholinestérase	85 à 89
4°. Anticholinestérase	89
5°. Phosphoestérases	89 à 93
6°. Facteurs de diffusion	93 à 94
7°. Protéases	94 à 96

